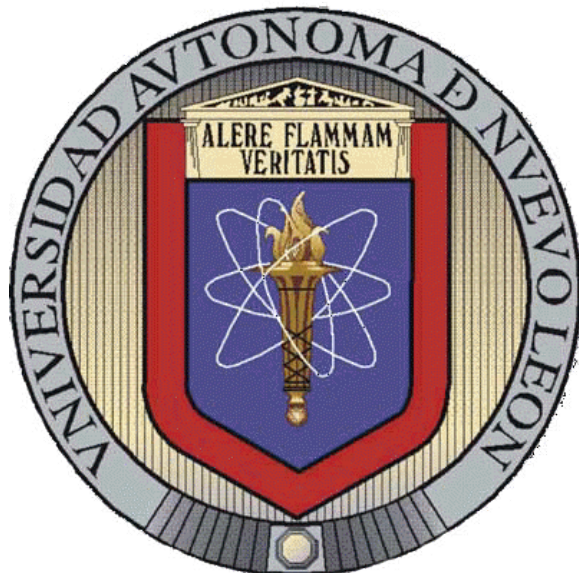


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LACASAS Y ESTERASAS PARA SU
EVALUACIÓN COMO BIORECEPTOR EN LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA
DE PESTICIDAS PIRETROIDES

POR

VERÓNICA AGLAEÉ ESQUIVEL BLANCO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

JUNIO 2020

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LACASAS Y ESTERASAS PARA SU
EVALUACIÓN COMO BIORECEPTOR EN LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA
DE PESTICIDAS PIRETROIDES

Aprobación de Tesis:

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
ASESORA

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LACASAS Y ESTERASAS PARA SU
EVALUACIÓN COMO BIORECEPTOR EN LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA
DE PESTICIDAS PIRETROIDES

Revisión de Tesis:

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
ASESORA

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó
COMITE TUTORIAL

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
COMITE TUTORIAL

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
COMITE TUTORIAL

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora académica, la Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado, por el tiempo y paciencia dedicado, por brindarme la oportunidad para realizar el proyecto, por los consejos y el apoyo que me brindo todo este tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado con número de CVU 932079 para la realización de este proyecto y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la UANL [Número de subvención CE866-19, 2019].

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas, por ser mi casa de estudio desde licenciatura y permitirme crecer como profesionista. Así mismo agradezco a los profesores que me impartieron clases durante el primer año de maestría, por su dedicación y por haber compartido sus conocimientos.

A mi comité tutorial, a la Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó, al Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu y el Dr. Edgar Allan Blanco Gámez por guiarme en la elaboración del proyecto, por sus correcciones, sugerencias e interés en la revisión de este trabajo de investigación.

Al Tecnológico de Monterrey, por brindar infraestructura en la realización de las pruebas electroquímicas.

A mis compañeros de laboratorio, por los momentos que pasamos y por el apoyo mutuo y por los consejos que me brindaron en la parte experimental, especialmente a Ana y Alexia por brindarme su amistad, por nunca dejar que me rindiera cuando las cosas salían mal y por siempre estar a mi lado en la vida y en el proyecto.

Y por último a mi familia, por brindarme su apoyo incondicional, especialmente a mis padres y mis hermanos, los cuales me han acompañado en este trayecto brindándome tiempo y comprensión cuando más lo necesitaba.

DEDICATORIA

A mis padres, que siempre estuvieron a mi lado brindándome apoyo incondicional.

A mi hermana, que me brinda su tiempo y me acompaña en cada paso que doy.

A mi novio, que siempre cree en mí y esta presente en las buenas y en las malas.

Con amor, Aglaeé.

ÍNDICE GENERAL

NOMENCLATURA.....	- 1 -
ÍNDICE DE FIGURAS.....	- 2 -
RESUMEN	- 3 -
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	- 5 -
1.1 Contaminantes emergentes.....	- 5 -
1.2 Pesticidas piretroides	- 5 -
1.3 Biosensores	- 7 -
CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES	- 9 -
CAPÍTULO 3 APORTACIÓN CIENTÍFICA	- 12 -
CAPÍTULO 4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 12 -
4.1 Hipótesis.....	- 12 -
4.2 Objetivo general.....	- 12 -
4.3 Objetivos específicos	- 12 -
CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS	- 13 -
5.1 Localización.....	- 13 -
5.2 Equipo	- 13 -
5.3 Reactivos	13
5.4 Material Biológico.....	14
5.5 Producción de enzimas lacasa y esterasa a partir de las bacterias <i>S. aureus</i> T3C3 y <i>B. cereus</i> T3A1..	14
5.5.1 Reactivación de la cepas <i>B. cereus</i> T3A1 y <i>S. aureus</i> T3C3	14
5.5.2 Producción de enzimas lacasas por <i>S. aureus</i> T3C3.....	15
5.5.3 Producción de enzimas esterasas por <i>B. cereus</i> T3A1	15
5.6 Evaluación de la actividad enzimática y cuantificación de proteínas en las enzimas producidas	16
5.7 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos ...	17
5.8 Inmovilización covalente de las enzimas a electrodos de oro para realizar mediciones electroquímicas	18
5.8.1 Funcionalización de la superficie de oro.....	18
5.8.2 Inmovilización	18
5.9 Evaluación y determinación los parámetros analíticos de la medición electroquímica	19

CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1. Producción enzimas lacasa y esterasa a partir de las bacterias <i>S. aureus</i> T3C3 y <i>B. cereus</i> T3A1.....	21
6.2 Evaluación de la actividad enzimática y cuantificación de proteínas en las enzimas producidas	23
6.3 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos ...	26
6.4 Inmovilización covalente de las enzimas a electrodos de oro para realizar mediciones electroquímicas	28
6.5 Evaluar y determinar los parámetros analíticos de la medición electroquímica.....	30
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES.....	35
PERSPECTIVAS	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

NOMENCLATURA

SIGLAS

CE: Contaminantes emergentes

PTAR: Planta tratadora de aguas residuales

EUA: Estados Unidos de América

EIS: Espectroscopía de impedancia

SPR: Resonancia superficial de plasmones

UV-vis: Ultravioleta-visible

sp. (latin); Especies

ADN: Ácido desoxiribonucleico

K₂HPO₄: Fosfato de potasio dibásico

KCl: Cloruro de potasio

NaNO₃: Nitrato de sodio

MgSO₄·7H₂O: Sulfato de magnesio heptahidratado

FeSO₄·7H₂O : Sulfato de hierro heptahidratado

CuSO₄: Sulfato de cobre

LOD: Límite de detección

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) clorhidrato de carbodiimida

GC-MS: Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas

LC-MS: Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas

NHS: N-hidroxisuccinimida

SD: Desviación estándar

UNIDADES

M: molar

nM: nanomolar

μ M: micromolar

mM: milimolar

mg L⁻¹: miligramo por litro

ng L⁻¹: nanogramo por litro

μ L⁻¹: microgramo por litro

mA/ mg L⁻¹: miliamperes por miligramo por litro

nm: nanómetros

ml: mililitro

rpm: revoluciones por minuto

μ l: Microlitros

°C: Grados centígrados

min: minutos

R: coeficiente de correlación

s: segundos

%: Por ciento

g: gramos

pH: Potencial de hidrógeno

U/mg: unidad enzimática por miligramos

ϵ : Coeficiente de extinción molar

V: voltaje

V/s: voltaje por segundo

% v/v: porcentaje volumen-volumen

h: Horas

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Estructura química de: a) Permetrina (piretroide tipo I) y b) Cipermetrina (piretroide tipo II). . -</i>	<i>6 -</i>
<i>Figura 2 Estructura de un biosensor. Figura adaptada de Sandoval & Herrera, 2010 [10].....</i>	<i>7 -</i>
<i>Figura 3 Estructura química de (a) la permetrina y (b) el 3-fenoxibencilaldehído.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4 Proceso de funcionalización e inmovilización. Figura adaptada de Casero, 2013 [42].....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5 Caldo nutritivo antes y después de la reactivación de las cepas a) S. aureus T3C3 y b) B. cereus T3A1.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6 Curvas de crecimiento de la bacteria S. aureus T3C3.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7 Curvas de crecimiento de la bacteria B. cereus T3A1.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8 Cinética de actividad enzimática de lacasas frente a ABTS como sustrato. Como inserto se encuentra la curva de calibración empleada en la cuantificación de proteínas.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9 Cinética de actividad enzimática de esterases frente a p-nitrofenol acetato como sustrato. Como inserto se encuentra la curva de calibración empleada en la cuantificación de proteínas.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 10 Análisis UV-vis del tratamiento enzimático usando 100 U mg⁻¹ de lacasas a pH 4.5 en una solución de 100 ppm de (a) permetrina y (b) 3 PBA. Monitoreo a 0 h (--), 2 h(--), 4h (--).....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 11 Análisis UV-vis del tratamiento enzimático usando 100 U mg⁻¹ de esterasa a pH 6 en una solución de 100 ppm de permetrina. Monitoreo a 0 h (--), 2h(--), 4h (--).....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 12 Imagen SEM del corte transversal de un electrodo de oro (a) previo y (b) posterior al proceso de inmovilización.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 13 Comparación de electrodos con lacasas y lacasa/esterasa en la detección de 10 ppm de permetrina y 3-PBA.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 14 Voltamperometría cíclica de (a) permetrina y (b) 3-PBA (-) y su respectiva solución blanco (-). En inserto se encuentran algunas voltamperometrías a diferentes concentraciones.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 15 Voltamperometría cíclica de (a) permetrina y (b) 3-PBA a concentraciones de 10 ppm (-), 7 ppm (-), 5 ppm (-), 3 ppm (-), 1 ppm (-). En inserto se encuentran la curva de calibrado de cada analito. 33</i>	

RESUMEN

Verónica Aglaeé Esquivel Blanco

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación: Junio, 2020

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Título del estudio: Inmovilización de enzimas lacasas y esterases para su evaluación como bioreceptor en la detección electroquímica de pesticidas piretroides.

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Número de páginas: 46

México tiene una alta incidencia en el uso de pesticidas piretroides, tanto en los cultivos agrícolas como en la fumigación de hogares. Si embargo, existen reportes que indican que la exposición a estos productos puede provocar efectos de carcinogenicidad, inmunotoxicidad, trastornos del desarrollo neurológico, etc. Actualmente estos compuestos son detectados por técnicas sumamente sensibles como la cromatografía, pero que requieren equipos costosos, personal capacitado y son de difícil uso para monitoreo en campo (análisis *in-situ*). Es por ello que, existe una necesidad por desarrollar nuevas herramientas analíticas que permitan eficientizar el monitoreo de este tipo de compuestos que ponen en riesgo la salud de la población.

Este estudio se centró en el desarrollo de un biosensor electroquímica basado en la inmovilización de enzimas lacasa/esterasa sobre un electrodo de oro para la detección del pesticida piretroide permetrina, así como uno de sus metabolitos, el 3-fenoxilbencilaldehído (3-BPA). Para ello 2 cepas productoras de estas enzimas fueron reactivadas. Por un lado, la bacteria *B. cereus* T3A1 fue empleada para producir esterases mientras que *S. aureus* T3C3 produjo lacasas. Se realizó la cuantificación de la actividad enzimática de las enzimas y posteriormente fueron inmovilizadas covalentemente sobre electrodos de oro. Los electrodos fueron previamente funcionalizados con grupos carboxílicos, los cuales interaccionaron con los aminoácidos de las enzimas para formar enlaces amida y quedar unidos al sistema. A los electrodos con enzima inmovilizada se les realizaron pruebas de actividad enzimática para cerciorarse que éstas seguían activas

después del proceso de inmovilización, además se tomaron micrografías SEM para observar cambios morfológicos en la superficie del electrodo. Finalmente, se integró un sistema bioelectroquímico de tres electrodos, que consistió en nuestro electrodo de oro inmovilizado con enzimas, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia Ag / AgCl. Con este sistema se realizaron voltamperometrías cíclicas para detectar los 2 analitos, la permetrina y el 3-PBA. El límite de detección obtenido para la permetrina fue de 0.94 mg L⁻¹, mientras que para el 3-BPA fue 3.9 mg L⁻¹. Por otro lado, la sensibilidad del método de detección para la permetrina y 3-BPA fue de 0.04 mA/mg L⁻¹ y 0.0074 mA/ mg L⁻¹, respectivamente.

Conclusiones y contribuciones:

El conjunto de datos obtenidos demostró que las enzimas lacasa/esterasa inmovilizadas pueden ser empleadas como bioreceptores en la detección de permetrina y el 3BPA, por lo cual lo hace un fuerte candidato para la detección de otros pesticidas piretroides. Cabe mencionar que es la primera vez que este sistema bi-enzimático es empleado en un biosensor para la detección de piretroides. Por lo cual, los resultados de la evaluación permiten contribuir al desarrollo de herramientas analíticas que permitan la detección temprana de estos compuestos.

Firma del asesor: _____

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes emergentes

El uso incalculable de productos químicos, por una sociedad en constante crecimiento, ha traído consigo la presencia de contaminantes móviles y persistentes en el aire, agua, suelo y sedimentos. Este consumo masivo de compuestos químicos empleados en el hogar, ya sea de limpieza o de cuidado personal (cosméticos, fármacos, etc.) ha provocado el surgimiento de la clasificación de contaminantes emergentes (CE) [1]. A pesar que, la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente generalmente se encuentra en un rango de concentración muy bajo, de mg L^{-1} a ng L^{-1} , la mayoría de estos compuestos están diseñados para ser biológicamente activos, causando afecciones en los organismos que entran en contacto con ellas [2].

En este sentido, los CE han sido relacionados con actividad anti androgénica en humanos, enfermedades del tracto-respiratorio, del sistema nervioso e inmunológico, problemas de la piel y enfermedades crónicas [3]. Además de daños al medio ambiente y a la biodiversidad al tener efectos endocrinos y de neurotoxicidad en algunas poblaciones de peces y mejillones [3].

En general, estos compuestos ingresan a los sistemas de alcantarillado urbano a través de la excreción humana en orina y heces, mediante la eliminación inadecuada de pesticidas y biocidas o la lixiviación en áreas urbanas durante los eventos de lluvia. En las plantas tratadoras de agua residual (PTAR), muchos de estos compuestos orgánicos no se eliminan y, por lo tanto, son un aporte relativamente constante a las aguas superficiales, llegando incluso al agua potable. En EUA se ha llegado a detectar en agua de grifo, hasta 15 diferentes tipos de CE con concentraciones que varían entre los $\mu\text{g L}^{-1}$ y los ng L^{-1} [4]. Mientras que en México ya se conoce la presencia de estos micro contaminantes en agua superficial y subterránea, siendo más común la incidencia de fármacos, plastificantes, productos de cuidado personal y pesticidas [4].

1.2 Pesticidas piretroides

En particular, México tiene una alta incidencia de pesticidas en sus cuerpos de agua, ya que, históricamente estos compuestos se han utilizado extensivamente en la agricultura para proteger los cultivos de las plagas y malezas, además de ser empleados en programas de fumigación para la protección de la salud pública, con la finalidad de evitar

enfermedades transmitidas por mosquitos, como la malaria y el dengue [5]. En México, los pesticidas organofosforados y piretroides son los más comúnmente empleados [6]. Sin embargo, los pesticidas piretroides causaron especial interés al ser introducidos al mercado en 1960, como compuestos que evitarían los problemas ambientales que los pesticidas organofosforados y carbamatos estaban causando [7]. Por lo tanto, mucho tiempo fueron considerados entre los insecticidas más seguros y disponibles para el control de plagas en agricultura, salud pública, horticultura y aplicaciones veterinarias agrícolas [6].

Los piretroides son compuestos de origen sintético, basados en la estructura natural de las piretrinas, las cuales están presentes en las flores de crisantemos (*Chrysanthemum sp.*), la estructura piretroide básica consiste en un ácido y un alcohol con un enlace éster [8]. Estos compuestos se pueden dividir en dos grupos, piretroides tipo I que contienen en su estructura un ciclopropano unido a un grupo carboxílico y piretroides de tipo II que contienen un grupo ciano (ver Figura 1), el cual está asociado a un incremento en sus propiedades insecticidas [8].

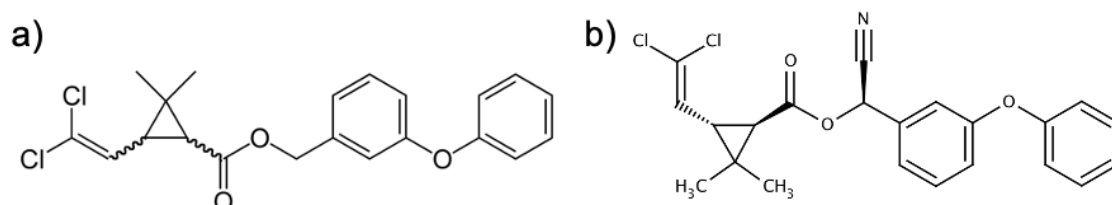


Figura 1 Estructura química de: a) Permetrina (piretroide tipo I) y b) Cipermetrina (piretroide tipo II).

Estos insecticidas son de amplio espectro, muy lipofílicos, y altamente estables a la luz y a la temperatura. Sin embargo, dicha estabilidad ha traído como consecuencia la detección de residuos piretroides en productos agrícolas [4], alimentos [5, 6] y agua superficial [7, 8]. Además, estudios recientes han relacionado algunos metabolitos piretroides con daños en el ADN de los espermatozoides humanos, lo que generó preocupaciones sobre los posibles efectos negativos en la salud reproductiva humana. También se debe mencionar que hay preocupación sobre su posible capacidad para mostrar neurotoxicidad en el hombre [8].

Es por ello que, en los últimos años se ha enfatizado la necesidad de desarrollar plataformas de control y monitoreo ambiental que permitan la detección temprana de contaminantes ambientales. Los métodos analíticos actuales para la detección de piretroides son usualmente técnicas cromatográficas acopladas a detectores universales como UV o espectrometría de masas y métodos de inmunoensayo, logrando altos niveles de sensibilidad y precisión. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas requieren equipos costosos, largos tiempos de análisis y personal capacitado, además de ser de difícil uso para monitoreo en campo (análisis in-situ).

1.3 Biosensores

Debido a lo anterior existe un creciente interés por desarrollar técnicas de monitoreo bioanalíticos, tales como los biosensores, que ofrecen ventajas sobre las técnicas clásicas en términos de portabilidad, menor costo, buena sensibilidad, la posibilidad de análisis de matrices complejas sin pretratamiento extenso, variedad de plataformas y tiempos de respuesta cortos [9].

Un biosensor es un dispositivo analítico que consiste en dos componentes, el sistema de identificación bioquímica también llamado bioreceptor (por ejemplo: enzimas, células, anticuerpos y ADN) y el transductor, que traduce la información del evento bioquímico a una salida de dominio físico que pueda ser cuantificable. La amplitud de la señal dependerá de la concentración del analito [9].

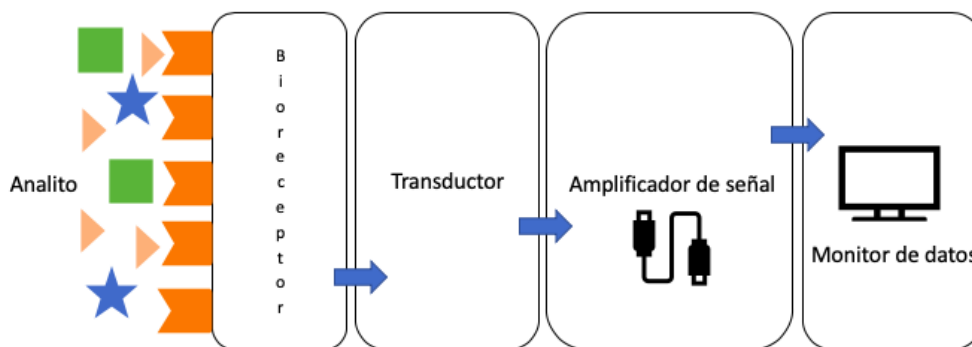


Figura 2 Estructura de un biosensor. Figura adaptada de Sandoval & Herrera, 2010 [10]

Dado que muchos pesticidas son diseñados con el principio de inhibir un proceso enzimático clave, el uso de biosensores electroquímicos basados en la inhibición enzimática resultan particularmente relevantes, ya que, realizan la detección cuantitativa de un determinado contaminante en función de su toxicidad [11]. Sin embargo, un biosensor electroquímico también es capaz de trabajar en condiciones no inhibitorias, basando su detección en la producción de electrones por catálisis enzimática del tipo óxido-reducción. El analito y la enzima participan en la reacción y los iones producidos crean un potencial, que se sustrae del electrodo de referencia para proporcionar una señal eléctrica estudiados [12].

Dentro de las moléculas empleadas como bioreceptor, las enzimas presentan grandes ventajas por su alta estabilidad, fácil producción y poseer un alto espectro de reconocimiento. Tanto las enzimas oxidasas como las hidrolasas han sido ampliamente reportadas como bioreceptores para el desarrollo de sensores electroquímicos [13].

Por un lado, las enzimas oxidasas poseen la capacidad de catalizar reacciones de transferencia de electrones en compuestos fenólicos bajo la presencia de oxígeno molecular [14]. Dentro de la clasificación de enzimas oxidasas, se encuentran las lacasas, tirosinasas y peroxidasas, las cuales pueden ser producidas por hongos del género *Rhus*, *Trametes* y *Aspergillus* [14], [15]; por bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Streptomyces* [16]; y en plantas del género *Pinus*, *Acer*, y *Nicotiana* [17].

Mientras que, las enzimas hidrolasas catalizan la escisión de diferentes tipos de enlaces químicos por hidrólisis [13]. Entre ellas se encuentran las esterasa, lipasas y fosfolipasas, distribuidas ampliamente en bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, y *Streptomyces* [18], [19]; por hongos del género *Eupenicillium*, *Pestalotiopsis*, y en plantas del género *Nepenthes* [20].

Por lo anterior, la presente propuesta busca mediante el uso de enzimas lacasas y esterasas producidas por las bacterias del género *S. aureus* y *B. cereus*, brindar una alternativa a la detección electroquímica de pesticidas piretroides y sus metabolitos, vinculando sus propiedades catalíticas con la estructura química de los analitos.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

A medida que aumenta el uso de insecticidas piretroides, también lo hacen las preocupaciones sobre la salud humana. Desde hace algunas décadas, estos compuestos han sido considerados dentro de la clasificación de contaminantes emergentes (CE), ya que son considerados como posibles disruptores endocrinos, capaces de imitar a las hormonas naturales en el cuerpo. En 2017, Zepeda-Arce y colaboradores asociaron la exposición ocupacional de trabajadores a pesticidas organofosforados y piretroides con estrés oxidativo en las células, además de ocasionar daños en el ADN [6]

Otros efectos adversos están relacionados a carcinogenicidad, inmunotoxicidad, trastornos del desarrollo neurológico y anomalías del sistema nervioso central en lactantes [21]. Se cree que la exposición de la población a estos compuestos ocurre a través de residuos piretroides en alimentos, el agua potable o por contacto con partículas remanentes en el aire y polvo después de la aplicación en hogares. Así mismo, los agricultores y los fabricantes pueden recibir sobreexposición ocupacional por inhalación y contacto dérmico [21]. Es por ello que su detección ha cobrado gran importancia.

De acuerdo con los datos reportados por los Servicios de Información Toxicológica de México (SINTOX), los casos de intoxicación por pesticidas reportados durante el 2012, pertenecen a los grupos: organofosforados con el 19%, Piretroides 20%, carbamatos 14%, bupiridilos 6%, fosfóricos 5%, organoclorados 1%, clorofenólicos 1%, otros 19% y desconocidos 15% [22].

Actualmente, la detección de estos compuestos se realiza principalmente mediante técnicas convencionales como la cromatografía. Por ejemplo, en el 2018 Morgan y colaboradores reportaron la cuantificación de siete pesticidas piretroides y seis metabolitos utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas [23]. Mientras que, El-Saeid y Khan, probaron la eficiencia del método de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) para determinar siete piretroides y uno de sus metabolitos [24]. Por otro lado, Wang y colaboradores en 2019 probaron un método sensible para determinar seis piretroides mediante cromatografía de gases y detección de captura de electrones (GC-ECD) [25]. Sin embargo, la tendencia actual por desarrollar nuevas técnicas analíticas que permitan el monitoreo en campo y en tiempo real, ha cobrado un enorme auge.

Es por lo que, en la actualidad existen diversos reportes del desarrollo de biosensores para la detección de piretroides, así como de sus metabolitos. Los piretroides, al ser absorbidos por el organismo tienden a ser metabolizados por hidrólisis enzimática creando metabolitos como el ácido 3-fenoxibenzoico y 3-fenoxibencilaldehído, provenientes de los piretroides tipo I y II, respectivamente [26]. Los metabolitos se pueden estar presentes en la sangre o ser excretados en la orina u otras secreciones, por lo cual pueden emplearse como biomarcadores de exposición a piretroides [26]. Es por ello que, en 2019, científicos del Reino Unido desarrollaron un biosensor óptico basado en células enteras de *E. coli* para la detección del ácido 3-fenoxibenzoico (metabolito primario en la degradación de pesticidas). Este dispositivo permitió el análisis de muestras de orina y plasma, presentando un LOD de 3 ng ml⁻¹ [21].

Además, en la actualidad existen diversos reportes del desarrollo de biosensores empleando inmunoensayos para la detección específica de piretroides como la deltametrina y cipermetrina [27]–[29]. Además, la técnica de resonancia superficial de plasmones (SPR) acoplada a anticuerpos también ha sido empleada en la detección de deltametrina, logrando un LOD de 0.01 µg L⁻¹ [30].

La deltametrina también ha sido detectada a través de inmunoensayos electroquímicos, tal como el reportado por Fruhmman y colaboradores, donde se analizaron muestras de agua de mar sin ningún tratamiento previo, obteniendo un LOD de 4.7 µg/L [26] o el reportado por Castellarnau y colaboradores, basado en la espectroscopía de impedancia (EIS), obteniendo un LOD de 0.303 µg L⁻¹, sin embargo, dicha técnica exhibió gran dispersión en los resultados, disminuyendo la precisión del método [31].

Además, Arip y colaboradores, desarrollaron un biosensor potenciométrico basado en cambios de pH mediados por células inmovilizadas del hongo *Lentinus sajor-caju* ante la presencia del pesticida permetrina en muestras de madera. A condiciones óptimas de pH, concentración y carga fúngica, el biosensor demostró respuesta a las concentraciones de permetrina en un rango de un 1 a 100 µM [32].

Con respecto al uso de enzimas como bioreceptor para la detección de piretroides, Dominguez-Renedo et al. desarrollaron un ensayo amperométrico basado en la inactivación de la acetilcolinesterasa (AChE) ante la presencia de la permetrina, obteniendo un LOD de 8.1 ± 0.4 µM. El sistema usado consistió en electrodos

serigrafados donde la enzima AChE fue inmovilizada. De forma general, la AChE cataliza la hidrólisis de acetiltiocolina a tiocolina, sin embargo, la presencia de permetrina inhibe la actividad de AChE, lo que resulta en una menor producción de tiocolina y, por lo tanto, una disminución en la oxidación amperométrica [33].

Dada la toxicidad de estos pesticidas, muchos de los biosensores electroquímicos diseñados para su detección están basados en la inhibición de las enzimas empleadas como bioreceptor [11]. Sin embargo, en la actualidad existen diversos reportes que resaltan la habilidad de las enzimas lacasa [34] y esterasa [35], para biodegradar pesticidas piretroides, por lo cual su capacidad catalítica no es inhibida ante la presencia de estos compuestos.

Las esterasas pertenecen al grupo de enzimas hidrolasas y son capaces de hidrolizar una gran cantidad de compuestos que contienen enlaces éster. Estas enzimas se encuentran ampliamente estudiadas y se sabe que son producidas por diversas bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, y *Streptomyces* [18], [19]; por hongos del género *Eupenicillium*, *Pestalotiopsis*, y en plantas del género *Nepenthes* [20]. Estas enzimas han sido estudiadas en la degradación de piretroides como fenpropatrin, cipermetrin, permeirin, cihalotrin, deltametrin, fenvalerate, y bifentrin [35].

Por otro lado, las lacasas son enzimas ampliamente producidas por plantas (*Pinus*, *Acer*, y *Nicotiana*) [17], hongos (género *Rhus*, *Trametes* y *Aspergillus*) [14], [15] y bacterias (género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Streptomyces*) [16]. Las estructuras de las lacasas contienen cuatro iones de cobre que pueden catalizar reacciones de oxidación en presencia de oxígeno, lo que conduce directamente a la descomposición de varios compuestos fenólicos, fenol sustituidos (cloro y azufre) y algunas aminas aromáticas [36]. Algunos ejemplos de insecticidas piretroides biodegradados por estas enzimas se encuentran la cipermetrina [34], imiprotrina [37] y ácido 3-phenoxybenzoico [38].

CAPÍTULO 3 APORTACIÓN CIENTÍFICA

La presente propuesta busca mediante el uso de enzimas lacasas y esterases, producidas por las bacterias del género *S. aureus* y *B. cereus*, brindar una alternativa a la detección de pesticidas piretroides y sus metabolitos, vinculando sus propiedades catalíticas con la afinidad estructural de los analitos.

Contribuir al desarrollo de herramientas analíticas que permitan la detección temprana de pesticidas piretroides, empleando como bioreceptor las enzimas lacasa y esterasa producidas por bacterias, a fin de brindar una alternativa a la actual detección electroquímica indirecta (por inhibición) de piretroides y sus metabolitos.

CAPÍTULO 4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Las enzimas bacterianas, lacasa y esterasa, serán capaces de producir una respuesta electroquímica directa ante la presencia de un pesticida piretroide y sus metabolitos.

4.2 Objetivo general

Desarrollar un biosensor electroquímico a partir de la evaluación de la respuesta electroquímica generada por las enzimas lacasa y esterasa ante la presencia de un compuesto piretroide y sus metabolitos.

4.3 Objetivos específicos

- Producir enzimas lacasa y esterasa a partir de las bacterias *S. aureus* T3C3 y *B. cereus* T3A1.
- Cuantificar la actividad enzimática y cuantificación de proteínas en las enzimas producidas.
- Evaluar cualitativamente la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos.
- Inmovilizar covalentemente las enzimas a un electrodo de oro para realizar mediciones electroquímicas.
- Evaluar y determinar los parámetros analíticos de la medición electroquímica.

CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

Los experimentos realizados en este proyecto se llevaron a cabo en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico, dentro de las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2 Equipo

Balanza analítica (Sartorius Entris), Incubadora con agitación (Barnstead International/Shka-4000), Autoclave eléctrica a vapor en forma de olla (All American), Microscopio binocular (Carl Zeiss/Standard 25), Espectrofotómetro UV/VIS Cary 50 (Varian), Plancha con agitación (Thermoline), Potenciostato (Metrohm), Campana de flujo laminar (PRENDO), Fotómetro para microplacas (Thermo Scientific), Centrifuga (Thermo Scientific), Micropipetas (BioPette Plus), Incubadora con agitación (SHELL-LAB/1575) y pHmetro (HANNA).

5.3 Reactivos

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma ALDRICH), 11-mercaptopundecanol (MUD)(Sigma ALDRICH), 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) (Sigma ALDRICH), 3-Fenoxibencilaldehído (3-BPA) (Sigma ALDRICH), 4-nitrofenil acetato (Sigma ALDRICH), Aceite de olivo (Jaloma), Acetato de sodio (DEQ), Ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHDA) (Sigma ALDRICH), Agar nutritivo (BD Bioxon), Albúmina de suero bovino (Sigma ALDRICH), Alcohol etílico (DEQ), Alcohol metílico (CTR), Caldo Nutritivo (BD Bioxon), Cloruro de potasio (DEQ), Cloruro de sodio (JT Baker), Extracto de levadura (BD bioxon), MES (Sigma ALDRICH), Fosfato de potasio monobásico (PQM), Hidróxido de sodio (Fermont), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma ALDRICH), Reactivo bradford (Sigma ALDRICH), Fosfato de sodio dibásico (PQM), Sulfato de hierro heptahidratado (DEQ), Sulfato de magnesio heptahidratado (DEQ), Nitrato de sodio (DEQ), Sulfato de cobre (JT Baker), Acetato de sodio (DEQ) y Cloruro de magnesio (DEQ)

5.4 Material Biológico

Los microorganismos fueron donados por la Dra. Ma Elena Cantú Cárdenas del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las bacterias utilizadas fueron *Bacillus cereus* T3A1 y *Staphylococcus aureus* T3C3. Se conservan por medio de las resiembras cada 6 meses en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico (LIDB).

5.5 Producción de enzimas lacasa y esterasa a partir de las bacterias *S. aureus* T3C3 y *B. cereus* T3A1.

5.5.1 Reactivación de la cepas *B. cereus* T3A1 y *S. aureus* T3C3

Las bacterias *B. cereus* T3A1 y *S. aureus* T3C3 fueron reactivadas en caldo nutritivo a 37°C por 24 horas en una incubadora con agitación SHEL-LAB. Posteriormente, las cepas fueron propagadas empleando un volumen de 20 mL del mismo medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual se incubó a 37 °C a una agitación constante de 110 rpm durante 2 días. Una vez que se realizó la reactivación, las cepas fueron sembradas en placas de agar nutritivo (*B. cereus* T3A1) y agar BHI (*S. aureus* T3C3), con resiembra cada 4 semanas y conservados a 4°C.

A las resiembras de cada cepa se les realizó una tinción de Gram para corroborar su pureza. La tinción de Gram se llevó a cabo tomando una asada de las placas y se colocó en un portaobjetos, después se agregó una gota de agua y se dejó secar, una vez que la muestra se secó, se agregó cristal violeta y se dejó durante 1 minuto, transcurrido el tiempo el portaobjetos se enjuagó con agua destilada, posteriormente se agregó lugol durante 3 minutos, seguido de la adición de alcohol-acetona por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y se agregó safranina durante 1 minuto. Finalmente, la muestra se enjuagó y se dejó secar para su posterior observación al microscopio (CARL ZEISS) empleando el objetivo 100X, mediante la adición de una gota de aceite de inmersión.

5.5.2 Producción de enzimas lacasas por *S. aureus* T3C3

La producción de enzimas lacasas fue realizada al inocular la bacteria *S. aureus* T3C3 (1% de inóculo) en 10 ml del caldo de producción propuesto por Sondi et al. 2014, el cual consta de 0.6% p/v de extracto de levadura y 100 μ M de CuSO₄, pH 8 [39]. El cultivo se mantuvo en agitación durante 96 horas a 37°C y 110 rpm. Posteriormente el cultivo se propagó en 40 ml del mismo medio, por otras 96 horas a 37°C. Durante este proceso se tomaron alícuotas para medir su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis cary 50, con la finalidad de realizar una curva de crecimiento de la cepa.

Finalmente, el cultivo se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de actividad enzimática.

5.5.3 Producción de enzimas esterases por *B. cereus* T3A1

La producción de enzimas esterases fue realizada al inocular la bacteria *B. cereus* T3A1 (1% de inóculo) en 10 ml del caldo de producción propuesto por Sharma et al. 2016, el cual consta de 10 ml de aceite de oliva, 5 g/L de caldo nutritivo, 0.6 g/L KCl, 3 g L NaNO₃, 0.6 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O y 0.1 g/L K₂HPO₄ [40]. El cultivo se mantuvo en agitación durante 24 horas a 37°C y 110 rpm. Posteriormente el cultivo se propagó en 40 ml del mismo medio, por otras 24 horas a 37°C. Durante este proceso se tomaron alícuotas para medir su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis cary 50, con la finalidad de realizar una curva de crecimiento de la cepa.

Finalmente, el cultivo se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de actividad enzimática.

5.6 Evaluación de la actividad enzimática y cuantificación de proteínas en las enzimas producidas

El ensayo de actividad enzimática de la enzima lacasa fue determinada por medio de la medición espectrofotométrica (UV-Vis), de acuerdo al protocolo establecido por Zhang et al 2018. Para las pruebas se tomaron 200 μ L del sobrenadante del cultivo *S. aureus* T3C3 y se adicionaron a la mezcla de reacción (2 ml) que contiene el sustrato correspondiente. El 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) fue utilizado como sustrato, a concentración 10mM, en buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5. El cambio de la absorbancia fue medida a temperatura ambiente durante 30 minutos a 420 nm [41].

Por otro lado, el ensayo de actividad enzimática de la enzima esterasa fue realizado por medio de una medición espectrofotométrica (UV-Vis), empleando p-nitrofenol acetato (5mM en metanol) como sustrato. Para las pruebas se tomaron 40 μ L del sobrenadante del cultivo *B. cereus* T3A1 y se adicionaron a la mezcla de reacción que contiene 60 μ L de sustrato y 1.9 ml de buffer fosfato 0.1 M (pH 7.0) de acuerdo al protocolo establecido por Sharma et al 2016. El cambio de la absorbancia fue medida a temperatura ambiente 40 minutos a 410 nm [40].

La actividad enzimática fue expresada como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ M de producto por minuto (U). La actividad enzimática fue calculada con la siguiente ecuación:

$$Actividad\ en\ \frac{U}{L\left(\frac{\mu mol}{min \times L}\right)} = \frac{\left[\left(\frac{\Delta Abs}{min}\right) \times Vt\right]}{\varepsilon \times 10^4 \times 1 \times Vm} \quad Ec\ 1.$$

Donde: ΔAbs es el cambio en la absorbancia, Vt es el volumen total de la celda, ε es el coeficiente de extinción molar del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) ($36,000\ M^{-1}cm^{-1}$) a 420 nm o del p-nitrofenol ($17,800\ M^{-1}cm^{-1}$) a 410 nm y Vm es el volumen de la muestra [41].

Finalmente, la cuantificación de proteína en los extractos enzimáticos fue determinada por el método de Bradford, el cual consiste en la unión del colorante azul de Coomassie a la proteína. Se preparó una curva de calibrado empleando como estándar proteína albúmina sérica bovina en un rango de 0 a 1 mg/mL. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia en un fotómetro para microplacas, a una longitud de onda de 595 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.7 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos

Para esta prueba se emplearon como analitos el insecticida piretroide permetrina y uno de sus metabolitos, el 3-fenoxibencilaldehído (3-PBA). Las estructuras de ambos analitos se pueden observar en la Figura 3.

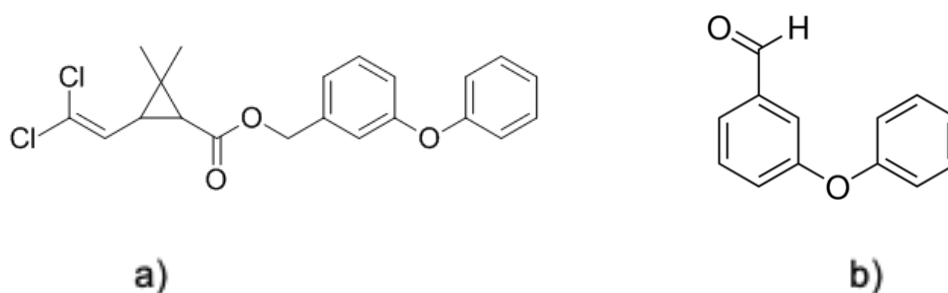


Figura 3 Estructura química de (a) la permetrina y (b) el 3-fenoxibencilaldehído

La prueba tiene por finalidad evaluar cualitativamente el efecto de la actividad catalítica de cada enzima en presencia de los analitos. Para la prueba con esterasas fue empleado el buffer McIlvaine 0.1M (pH 6.0) y para las lacasas el buffer de citratos 0.1 M (pH 4.5). Para llevar a cabo la evaluación, se preparó una mezcla de reacción que contenía 100 mg L⁻¹ de cada analito, 10% (v / v) de buffer y 100 U mg⁻¹ de enzima (sobrenadante de cultivos), la solución se mezcló homogéneamente y se protegió de la luz hasta su uso. La solución de reacción fue monitoreada cada 2 horas usando un espectrofotómetro UV-Vis para registrar los cambios en el espectro de absorción del analito de interés (rango de 200 y 800 nm). Los cambios en el espectro de absorción del analito serían atribuidos al efecto de las enzimas.

5.8 Inmovilización covalente de las enzimas a electrodos de oro para realizar mediciones electroquímicas

5.8.1 Funcionalización de la superficie de oro

Previo a la inmovilización de las enzimas es necesario realizar un proceso de funcionalización sobre la superficie de oro de los electrodos (50 nm). Este proceso consta de la formación de una capa de alcanotioles que sirven como agentes ligantes entre el oro y las enzimas. Para esta etapa se sumergió la laminilla de oro en una solución de ácido 16-mercaptohexadecanoico (250 μ M en etanol). Este compuesto tiene una estructura química que posee un extremo con grupo funcional de azufre que se une covalentemente al oro debido a la diferencia de electronegatividad, mientras que el otro extremo de la molécula presenta un grupo carboxilo que es capaz de unirse a los aminoácidos de lisina en las enzimas. Una vez transcurridas 12 horas, la laminilla es lavada con etanol y se deja secar al aire.

5.8.2 Inmovilización

Una vez unidos los alcanotioles al oro, estos deben activarse para permitir el posterior anclaje de las enzimas. Esta activación se realiza a través del método EDC / NHS (0.05 M/0.2 M) en una solución amortiguadora MES de concentración 0.01 M y pH 5.0. En este proceso se generan ésteres de carboimida que permite la unión de la enzima a través de sus aminoácidos formando un enlace amida (ver Figura 4). En el proceso de inmovilización se prepararon 2 tipos de electrodos, uno con 100 U mg⁻¹ de lacasa y otro electrodo con 100 U mg⁻¹ de cada enzima (esterasa y lacasa). Una vez que los electrodos de oro fueron inmovilizados se procedió a realizar un lavado y se conservaron en buffer fosfatos 0.1 M (pH 7.0) para su posterior uso en las mediciones electroquímicas.

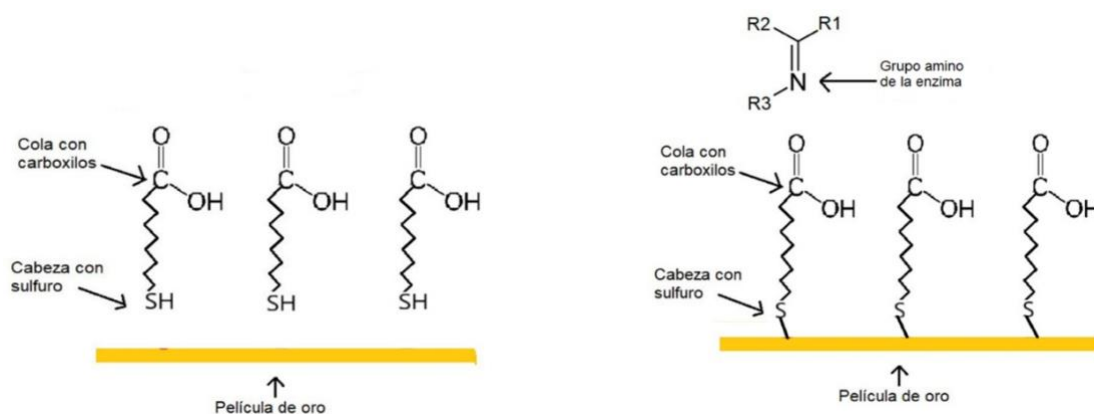


Figura 4 Proceso de funcionalización e inmovilización. Figura adaptada de Casero, 2013 [42]

La actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas fue determinada mediante el mismo proceso explicado, en la sección 5.6 de métodos, empleado en las enzimas libres. La diferencia radica en que la alícuota de sustrato para cada enzima fue adicionado directamente al sistema inmovilizado.

El porcentaje de inmovilización enzimática fue determinado por diferencia entre la concentración de proteínas (enzimas) en la solución previo a la inmovilización, así como posterior a ella. Para ello, se colocaron 150 μL de la mezcla de reacción de Bradford y después de finalizar la reacción se recuperó la solución con ayuda de una micropipeta para posteriormente lavar el electrodo.

Además, a los electrodos de oro se les realizó un corte transversal y se tomaron micrografías en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F, esto con la finalidad de ver la irregularidad de las capas depositadas en el oro después de la inmovilización.

5.9 Evaluación y determinación los parámetros analíticos de la medición electroquímica

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo utilizando un potenciostato Dropsens (metrohm). Se empleó el método de voltamperometría cíclica bajo un esquema de tres electrodos que consistió en nuestro electrodo de oro inmovilizado con enzimas, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia Ag / AgCl. Durante las mediciones electroquímicas se evaluaron 2 analitos, la permetrina y el 3-PBA, los cuales se encontraban en buffer McIlvain de pH 6.0.

Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo en un volumen de muestra de 10 ml, a temperatura ambiente (25°C) y sin agitación. Se registraron las curvas de voltaje/corriente de 0.1 a 1.2 V, con una velocidad de escaneo 0.1 V/s.

Para calibrar el biosensor, se inyectaron una serie de muestras (permetrina y 3-PBA) en un rango de concentración 0-10 ppm. La intensidad de la señal de corriente generada, representa la reacción entre la enzima y el analito, la cual será directamente relacionada a la concentración del pesticida evaluado.

A partir de estos valores se realiza una curva de calibración, de la cual se obtiene la regresión lineal y se establecen los parámetros analíticos del sensor. Entre estos parámetros analíticos se encuentran el límite de detección, el cual es calculado como la desviación estándar del ruido de respuesta. Además, se establece la sensibilidad (representada por la pendiente de la curva de calibrado) y el rango dinámico de trabajo (que corresponde al intervalo de la concentración máxima y mínima). Entre cada medición de muestra se realizan lavados de los electrodos para evitar la contaminación de las muestras. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Producción enzimas lacasa y esterasa a partir de las bacterias *S. aureus* T3C3 y *B. cereus* T3A1

Tal como se observa en la Figura 5, las cepas *B. cereus* T3A1 y *S. aureus* T3C3 fueron reactivadas en caldo nutritivo a 37°C/110 rpm por 24 horas en una incubadora con agitación SHEL-LAB. Una vez que se realizó la reactivación, las cepas fueron sembradas en placas de agar nutritivo (*B. cereus* T3A1) y agar BHI (*S. aureus* T3C3), de las cuales se obtuvieron colonias para realizar la tinción de gram. Bajo el microscopio, la cepa *B. cereus* T3A1 presentó una morfología de bacilo Gram positivo, característico de la bacteria. Mientras que la cepa *S. aureus* T3C3 se observó como cocos gram positivo.

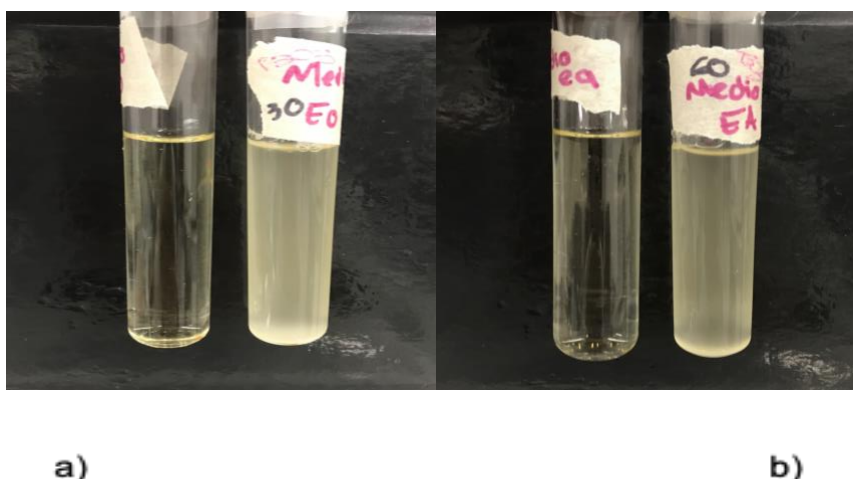


Figura 5 Caldo nutritivo antes y después de la reactivación de las cepas a) *S. aureus* T3C3 y b) *B. cereus* T3A1

Para la cinética de crecimiento de *S. aureus* T3C3 se utilizó el medio de producción de lacasas propuesto por Sondi et al. 2014, el cual consta de 0.6% p/v de extracto de levadura y 100 μ M de CuSO_4 , pH 8 [39]. Los medios fueron inoculados (triplicado) a una densidad óptica inicial de 0.05, luego se llevaron a incubación de 37 °C en agitación de 110 rpm. El crecimiento del cultivo trato de ser monitoreado cada 2 horas (sujeto a la disponibilidad y logística del CIBYN) por espectrofotometría de UV-Visible a una longitud de onda de 600 nm. Con la finalidad de fomentar la expresión de las enzimas lacasa a través del estrés del microorganismo, este medio de cultivo tiene una baja concentración de carbono, lo cual puede explicar el tiempo que necesitó la bacteria para alcanzar su máximo

crecimiento, siendo este alrededor de 72 h (ver Figura 6). A pesar que se procuró realizar los monitoreos de dicho crecimiento, cada 2 horas, la logística inherente al transporte para la ida y llegada al CIBYN evitó evaluar ciertos rangos de tiempo, lo cual es visiblemente notable en la Figura 6.

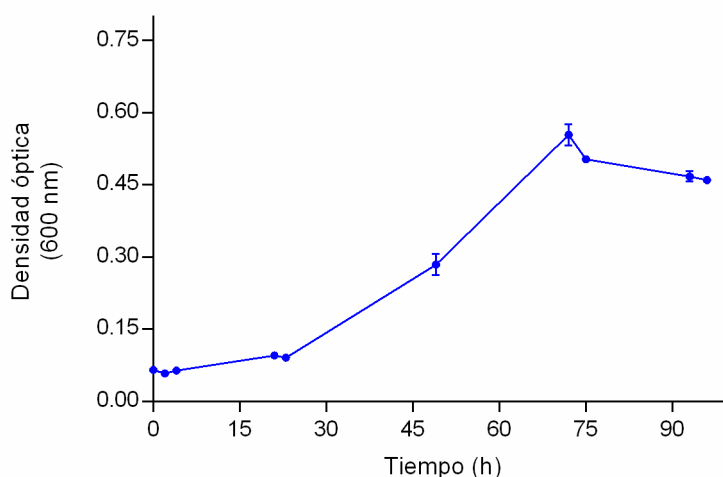


Figura 6 Curvas de crecimiento de la bacteria *S. aureus* T3C3

Mishra y colaboradores emplearon un medio de producción de lacasas con 2% de fuente de carbono, y obtuvieron un pico máximo de crecimiento a las 60 horas [43]. En comparación con nuestros resultados, esta disminución de tiempo en el crecimiento de la bacteria puede ser atribuido a la concentración de fuente de carbono en el medio, ya que nuestro cultivo carecía de este nutriente.

La cinética de crecimiento de la bacteria *B. cereus* T3A1 se realizó en el medio de producción de esterasas propuesto por Sharma et al. 2016, el cual consta de 10 ml de aceite de oliva, 5 g L de caldo nutritivo, 0.6 g L KCl, 3 g L NaNO₃, 0.6 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 FeSO₄·7H₂O y 0.1 g/L K₂HPO₄ [40]. Las muestras fueron inoculados a una densidad óptica inicial de 0.05, se mantuvieron en agitación durante 48 horas a 37°C y 110 rpm. El crecimiento del cultivo fue monitoreado por 32 horas por espectrofotometría de UV-Visible a una longitud de onda de 600 nm.

A diferencia de la cepa *S. aureus*, la bacteria del género *B. cereus* tuvo un crecimiento rápido, obteniendo su máximo pico a las 24 h (Figura 7). Lo anterior es de esperarse debido a la alta cantidad de nutrientes presentes en los componentes. Además de contar

con sales de potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) los cuales se ha reportado que son elementos importantes en el crecimiento de la bacteria así como para la estabilización de las esterasas, por lo que su producción se ve favorecida [40]. En este sentido, Grawe y colaboradores reportaron un crecimiento máximo a las 36 horas, este aumento en el tiempo de crecimiento podría ser atribuido a la disminución en la concentración de sales de magnesio y potasio empleando durante su estudio [13] .

Por otro lado, es importante mencionar que, en nuestro trabajo, ciertos rangos de tiempo no pudieron ser evaluados debido a dificultades con el transporte para la ida y llegada al CIBYN, lo cual es evidenciado en la Figura 7.

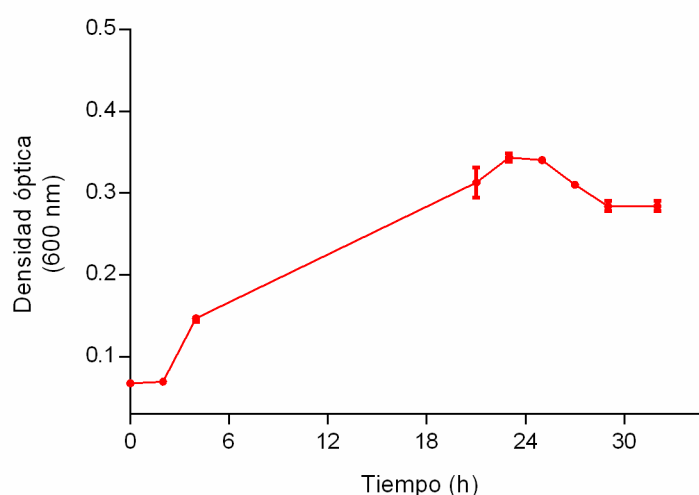


Figura 7 Curvas de crecimiento de la bacteria *B. cereus T3A1*

6.2 Evaluación de la actividad enzimática y cuantificación de proteínas en las enzimas producidas

Un trabajo previo, realizado por Silva-Salinas en 2017 [44] demostró la capacidad de la cepa *S. aureus* T3C3 de producir enzimas oxidorreductasas. Este antecedente motivó a inocular al microorganismo en un medio de cultivo que se sabe favorece la producción de lacasas [39]. El sobrenadante obtenido del cultivo fue evaluado frente al sustrato 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS), el cual es ampliamente

utilizado en la determinación de lacasas. La medición se realizó por medio espectrofotometría UV-Vis, de acuerdo al protocolo establecido por Zhang et al 2018. Para las pruebas se tomaron 200 μ L del sobrenadante del cultivo *S. aureus* T3C3, y se adicionó a la mezcla de reacción que contenía el 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) y el buffer [41] (Ver Figura 8).

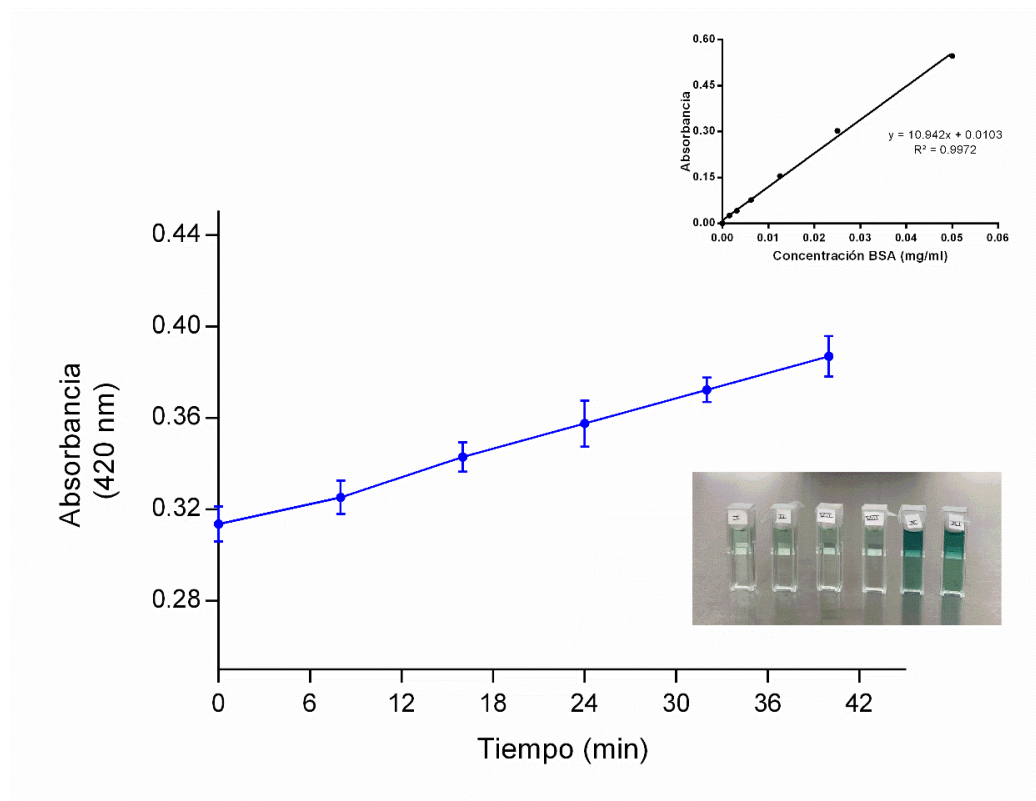


Figura 8 Cinética de actividad enzimática de lacasas frente a 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) como sustrato. Como inserto se encuentra la curva de calibración empleada en la cuantificación de proteínas.

La actividad enzimática fue calculada con extractos obtenidos a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Sin embargo, en los extractos obtenidos antes de 72 horas no se observó actividad enzimática, fue hasta las 96 horas que se obtuvo la máxima actividad de 331.5 U mg^{-1} (Figura 8), la cual fue considerablemente mejor en comparación con lo obtenido por Sondi et al. 2014, cuyo trabajo fue tomado como referencia para este experimento. En dicho estudio, el resultado de la actividad enzimática obtenido en el sobrenadante después de 96 horas de cultivo fue de 10.52 U mg^{-1} [39]. Mientras que Yasar et al 2019, reportaron una actividad enzimática de lacasas presentes en el extracto crudo (sobrenadante) fue de 260.3 U mg^{-1} , producido la cepa *Bacillus subtilis* LP2 [45], siendo este resultado similar con lo obtenido por nuestra cepa.

Por otro lado, el ensayo de actividad enzimática de las esterasas fue realizado después de 24 horas de incubación por medio de la medición espectrofotométrica (UV-Vis) empleando p-nitrofenol acetato (5mM en metanol) como sustrato, el cual es reportado comúnmente para la determinación de esterasas [10]. Este sustrato es empleado debido a que las esterasas se caracterizan por la hidrolizar ésteres hidrosolubles de ácidos grasos de cadena corta, a diferencia de las lipasas que se caracterizan por la hidrólisis de triacilglicerol de cadena larga [46].

Para las pruebas se tomaron 40 μ L del sobrenadante del cultivo *B. cereus* y se adicionaron a la mezcla de reacción con el sustrato y buffer fosfato 0.1 M (pH 7.0) de acuerdo con el protocolo establecido por Sharma et al 2016. El cambio de la absorbancia fue medida a temperatura ambiente durante 40 minutos a 410 nm [13].

En la Figura 9 se muestra la gráfica de la cinética enzimática de la producción de esterasas por *B. cereus* T3A1 obtenido a las 24 horas (pico máximo de producción). En este caso, el resultado del contenido de proteína fue de 0.04 mg, con una actividad enzimática específica de 103.7 U mg^{-1} , la cual es mayor al reportado por Ferreira-Grawe y colaboradores, cuyo trabajo reportó 33.08 U mg^{-1} obtenido al 6° día de incubación [13].

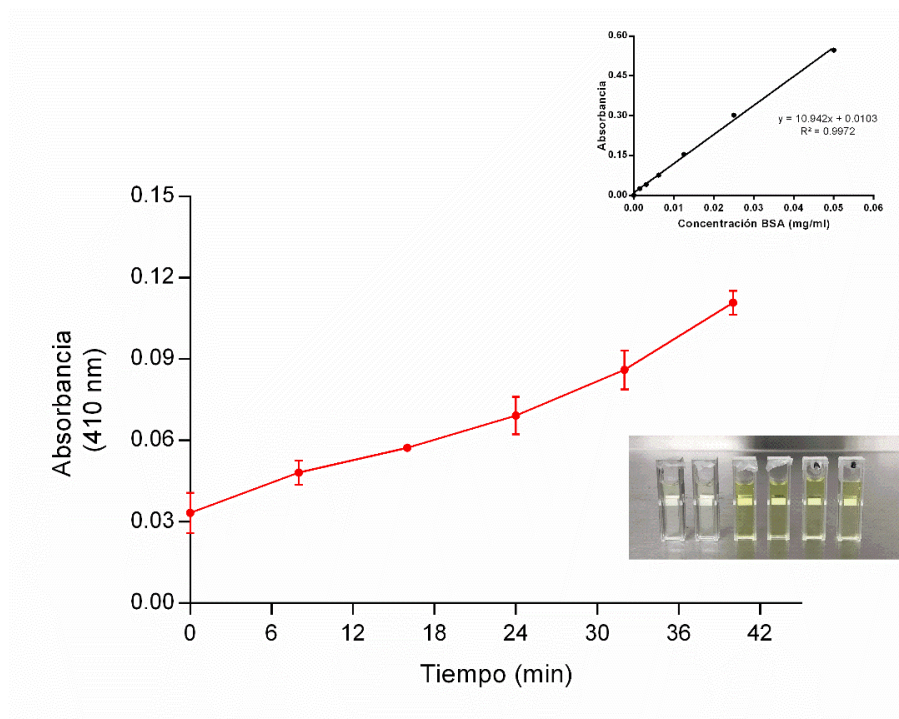


Figura 9 Cinética de actividad enzimática de esterasas frente a p-nitrofenol acetato como sustrato. Como inserto se encuentra la curva de calibración empleada en la cuantificación de proteínas.

Además, es importante resaltar que la actividad enzimática específica obtenida en nuestro trabajo es 11.7 veces mayor en comparación con el resultado obtenido en el estudio de Sharma y colaboradores [40], el cual fue tomado como referencia para la preparación del medio de cultivo para la producción de esterasas. En este estudio, se reportó una actividad enzimática de 8.8 U mg⁻¹ de las esterasas producidas por *Bacillus pumilus* y presentes en el sobrenadante [40].

6.3 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos

Para esta prueba se emplearon como analitos el insecticida piretroide permetrina y uno de sus metabolitos, el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). El análisis consistió en evaluar los cambios en el pico de absorción de cada uno de los analitos, los cuales serían atribuidos al efecto de las enzimas, esto con la finalidad de evaluar cualitativamente la posible interacción entre la enzima y la estructura del analito.

Para la prueba con esterasas fue empleado el buffer McIlvaine 0.1M (pH 6.0) y para las lacasas el buffer de citratos 0.1 M (pH 4.5), lo anterior debido a que según la literatura son los pH óptimos para estas enzimas [39], [47].

La mezcla de reacción contenía 100 ppm de cada analito, 10% (v / v) de buffer y 100 U mg⁻¹ de enzima (sobrenadante de cultivos). La solución de reacción fue monitoreada cada 2 horas usando un espectrofotómetro UV-Vis para registrar los cambios en el espectro de absorción del analito de interés.

En la Figura 10 se observa un ligero decremento en la intensidad del pico de absorción de la permetrina y el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA), siendo más notorio en la permetrina. Lo anterior se puede explicar debido a que la permetrina posee mayor número de sitios de ruptura en comparación con el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). Lo anterior concuerda con Mir-Tutusa et al., 2014 [37], quien estudió la capacidad de la enzima lacasa para degradar el piretroide cipermetrina, encontrando que el rompimiento de la molécula originó como productos de transformación el ácido 3- (2,2-diclorovinil) -2,2-dimetilciclopropano carboxílico (DCCA) y ácido 3-fenoxibenzoico (PBA) [37]. Además Zhao et al 2020, determinó que la presencia de las lacasas estaba ligada a degradación del ácido 3-fenoxibenzoico [38].

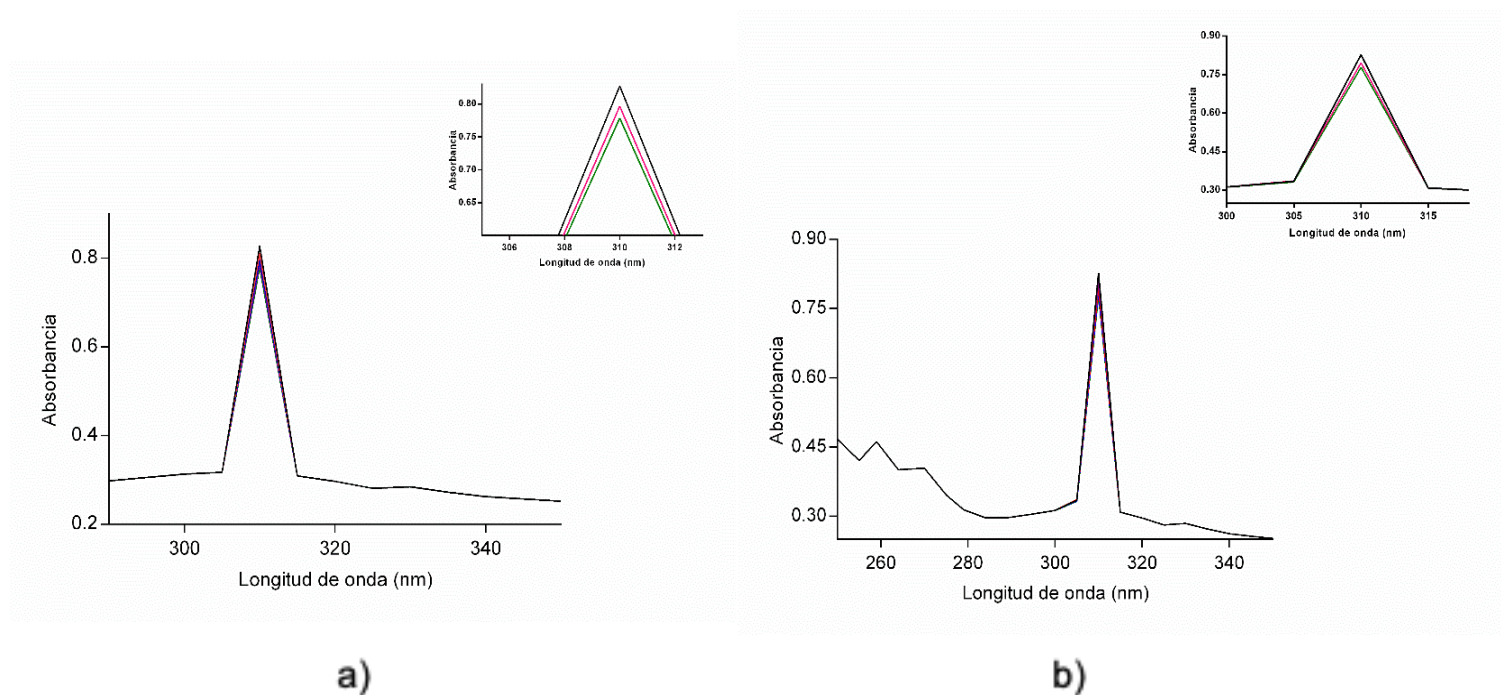


Figura 10 Análisis UV-Vis del tratamiento enzimático usando 100 U mg^{-1} de lacasas a pH 4.5 en una solución de 100 ppm de (a) permetrina y (b) 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). Monitoreo a 0 h (---), 2 h (---), 4h (---)

Con respecto al tratamiento de las enzimas esterasas, este solo fue aplicado en la permetrina, debido a que estas hidrolasas solo son capaces de hidrolizar compuestos que contienen enlaces éster. La Figura 11 muestra la ligera disminución que presenta el pico de absorción de este piretroide, al cabo de 4 horas de monitoreo. A pesar que esta prueba no es contundente para afirmar que las enzimas (lacasas y esterasa) están interaccionando con los analitos probados, si permite establecer una relación cualitativa con lo que otros autores han reportado acerca de la degradación de piretroides, como fenpropatrina, cipermetrina, permetrina, cihalotrina, deltametrina, fenvalerato y bifentrina, empleando estas enzimas [35].

Cabe mencionar que para confirmar que solo las lacasas y esterasas están teniendo interacción con los analitos, es necesario realizar una serie de etapas de purificación, seguida de la evaluación de la pureza y separación de estas enzimas por electroforesis SDS-PAGE. Sin embargo, dada la naturaleza de los analitos (permetrina y 3-fenoxibencialdehído (3-PBA)), se esperaría que la posible presencia de otras enzimas como lipasas o proteasas no tuviera actividad catalítica sobre ellos, ya que las lipasas se

caracterizan por tener actividad hidrolítica sobre triacilglicerolos de cadena larga [46], mientras que las proteasas tienen efecto sobre enlaces peptídicos [48].

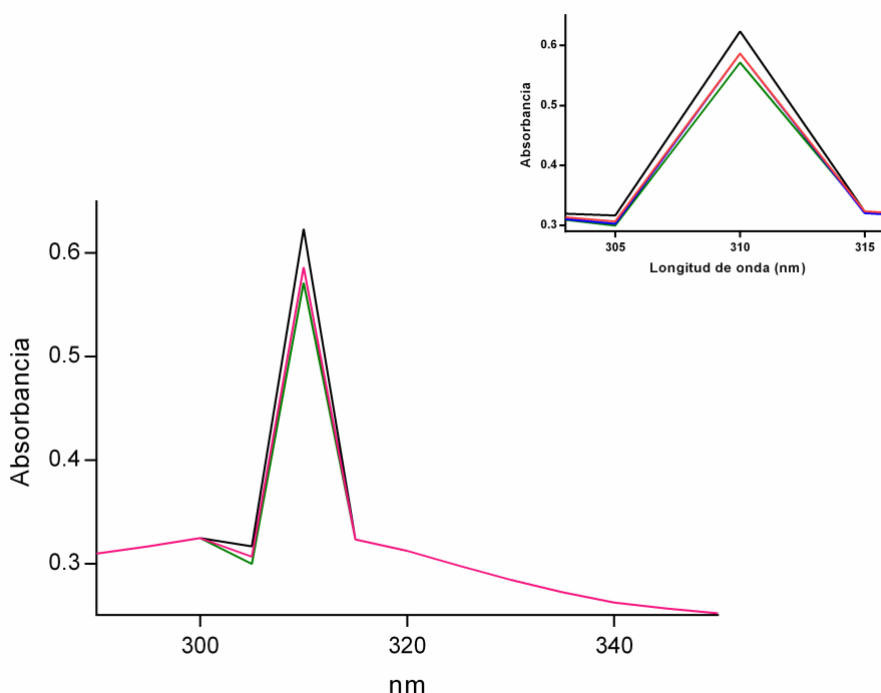


Figura 11 Análisis UV-Vis del tratamiento enzimático usando 100 U mg⁻¹ de esterasa a pH 6 en una solución de 100 ppm de permetrina. Monitoreo a 0 h (---), 2h(—), 4h (---)

6.4 Inmovilización covalente de las enzimas a electrodos de oro para realizar mediciones electroquímicas

La inmovilización de las enzimas se llevó a cabo a través de un proceso de funcionalización de la superficie de oro (50 nm) en los electrodos. En esta etapa se forma una capa de alcanotioles que sirven como agentes ligantes entre el oro y las enzimas. Posterior a 12 horas de incubación la laminilla de oro es lavada con etanol para proseguir con el proceso de activación de los alcanotioles a través del método EDC / NHS, los cuales generan ésteres de carboimida que permite la unión de la enzima. Después de llevar a cabo el proceso de inmovilización, se realizó la medición de actividad enzimática para comparar la actividad de las enzimas libres con respecto a las inmovilizadas. Para lo anterior se tomó como referencia las enzimas esterasas, ya que era de interés para este trabajo evaluar su aportación en la detección de los analitos al estar presentes en el

electrodo. El resultado de la actividad enzimática específica de las esterasas inmovilizadas fue de 61.08 U mg⁻¹, lo que representa una pérdida del 39% en la actividad con respecto a la actividad inicial (enzimas libres). El decaimiento de la actividad enzimática después de un proceso de inmovilización es esperado y comúnmente atribuido al bloque del sitio activo de la enzima a través del enlace covalente formado entre la molécula y el material, principalmente debido a que las inmovilizaciones no están orientadas y ocurren aleatoriamente [49], por lo cual también se esperaría tener un decaimiento en la actividad enzimática de las lacasas. La pérdida en la actividad enzimática obtenido en nuestro trabajo es comparable con el obtenido por Fan y colaboradores (2017), donde se reporta una pérdida del 40% en la actividad de las esterasas posterior a su inmovilización sobre sílice, empleando un método basado en la formación de enlaces covalentes, tal como en nuestro trabajo [50].

Por otro lado, a los electrodos se les realizó un corte transversal y se tomaron micrografías en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F, esto con la finalidad de ver la irregularidad de las capas depositadas en el oro después del proceso de inmovilización. Como se puede observar en la Figura 12, previo a la inmovilización, el film de oro contaba con un ancho cercano a los 49 nm, sin embargo, posterior al proceso de inmovilización este grosor cambió en un rango de entre 58 a 71 nm. Además, se puede observar como la capa se volvió más irregular después de la adición de las moléculas. Este fenómeno se puede atribuir a la formación de sistemas multicapa de enzima, formadas durante el proceso de inmovilización, a través del exceso de entrecruzante (reactivo EDC/NHS) que puede favorecer la unión enzima-enzima entre los grupos amino y carboxílico presente en los aminoácidos de estas enzimas, lo cual podría también acarrear problemas de inactivación enzimática (pérdida de actividad) [51].

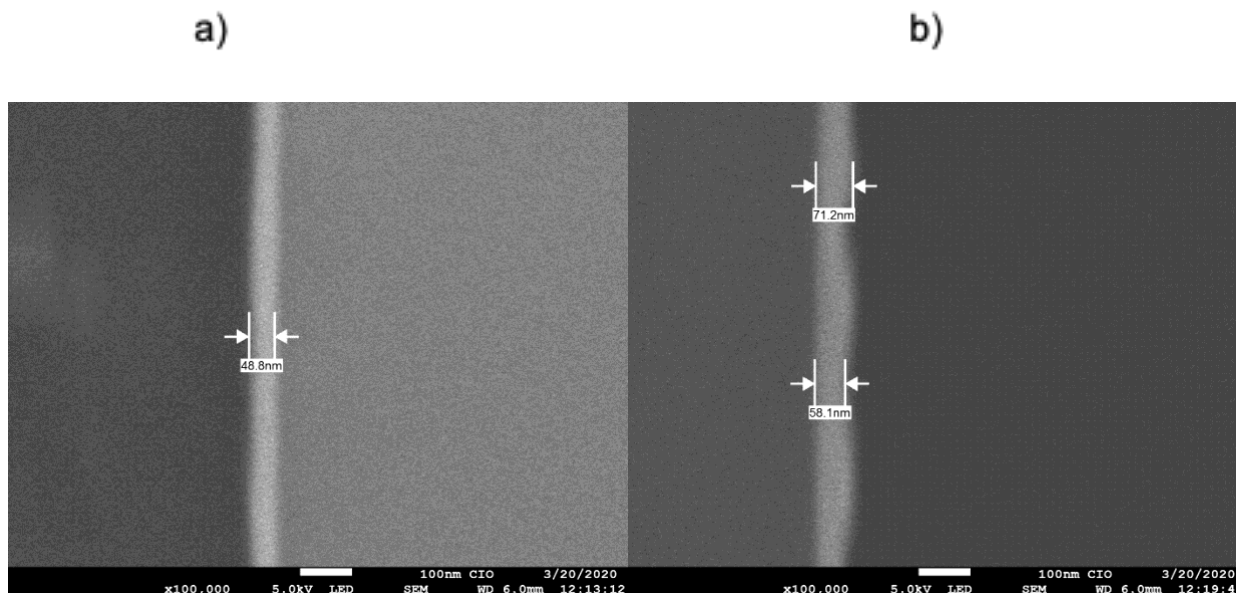


Figura 12 Imagen SEM del corte transversal de un electrodo de oro (a) previo y (b) posterior al proceso de inmovilización

6.5 Evaluar y determinar los parámetros analíticos de la medición electroquímica

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en un potenciostato Dropsens (metrohm). Se empleó el método de voltamperometría cíclica bajo un esquema de tres electrodos que consistió en nuestro electrodo de oro inmovilizado con enzimas, un contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia Ag / AgCl. Durante las mediciones electroquímicas se evaluaron 2 analitos, la permetrina y el 3-fenoxibenzaldehído (3-PBA), los cuales se encontraban en buffer McIlvain de pH 6.

Como una primera etapa se evaluaron 2 tipos de electrodos, uno inmovilizado únicamente con lacasas y otro inmovilizado con una combinación lacasa/esterasa. Las mediciones se llevaron a cabo en muestras que contenían 10 ppm de permetrina o 3-fenoxibenzaldehído (3-PBA). El resultado de estas pruebas se evidencia en la Figura 13, donde podemos observar que la adición de esterases al electrodo, favorece la detección del biosensor, generando mayor corriente por la reacción óxido-reducción catalizada por la enzima lacasa. En el caso de la permetrina, la reacción genera un 28% más de corriente cuando

la esterasa está presente, caso similar ocurre en la detección del 3-fenoxibencialdehído (3-PBA) donde el aumento se da en un 30%.

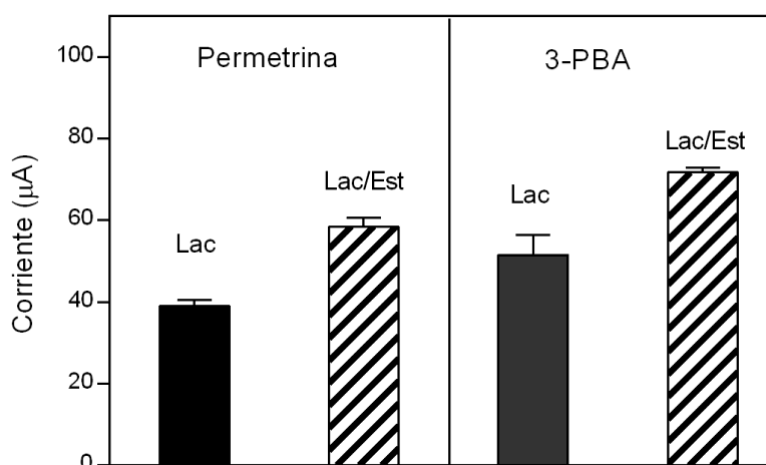


Figura 13 Comparación de electrodos con lacasas y lacasa/esterasa en la detección de 10 ppm de permetrina y 3-fenoxibencialdehído (3-PBA)

Lo anterior se debe a que la permetrina, que es reconocida por la esterasa, es convertida por hidrólisis a un ácido carboxílico y un alcohol [35], que inmediatamente son reconocidos por la lacasa. La generación de señal amperométrica resulta de la oxidación catalizada por la lacasa, de los productos secundarios, generados por la esterasa.

Este tipo de co-reacciones se han reportado en biosensores para detectar paracetamol, empleando esterassas/tirosinasas [52]; así como la detección de colesterol en suero a través del sistema de peroxidasa/colesterol oxidasa [53].

A partir de este resultado se decidió continuar con las mediciones electroquímicas empleando los electrodos inmovilizados con lac/est. Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo en un volumen de muestra de 10 ml, a temperatura ambiente (25°C) y sin agitación. Se registraron las curvas de voltaje/corriente de 0.1 a 1.2 V, con una velocidad de escaneo 0.1 V/s (Figura 14).

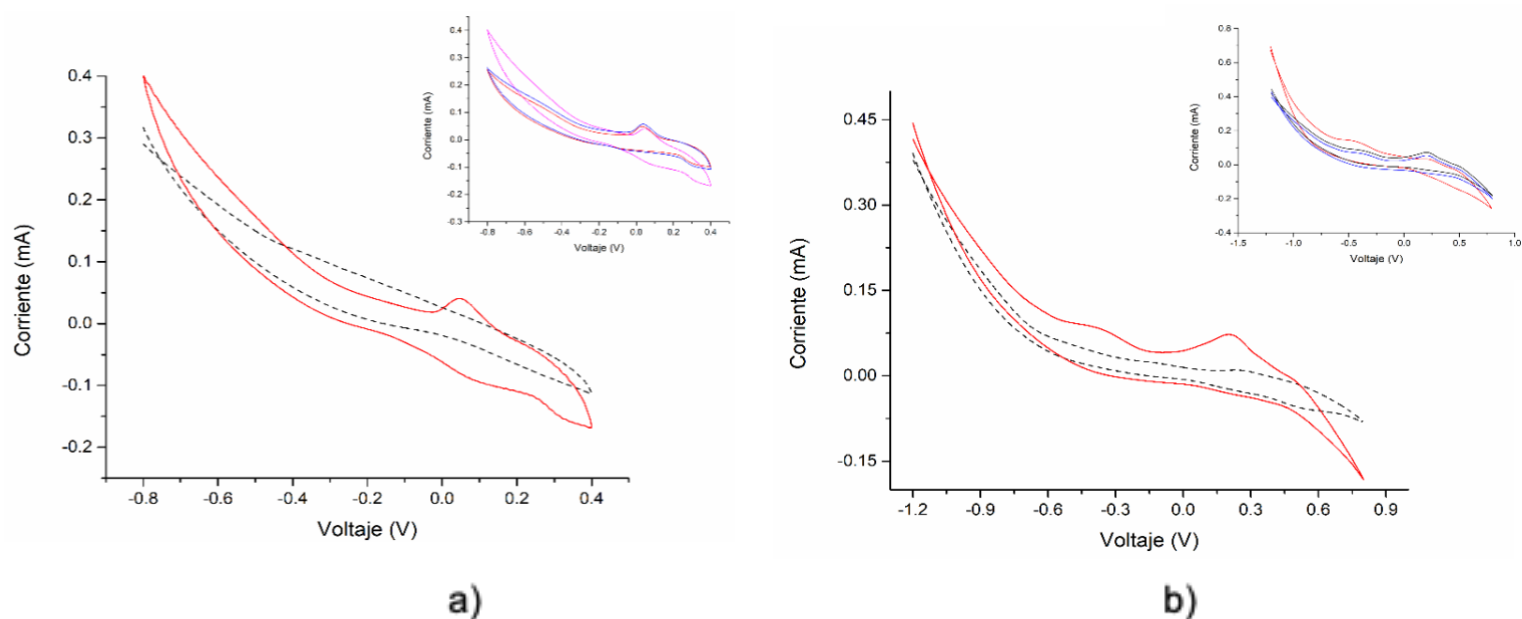


Figura 14 Voltamperometría cíclica de (a) permetrina y (b) 3-PBA (-) y su respectiva solución blanco (--). En inserto se encuentran algunas voltamperometrías a diferentes concentraciones

Para calibrar el biosensor, se inyectaron una serie de muestras de permetrina y 3-fenoxibencialdehído (3-PBA) en un rango de concentración 0-10 ppm. La intensidad de la señal de corriente generada, representa la reacción entre la enzima y el analito, la cual es directamente relacionada a la concentración del pesticida.

La Figura 15 muestra las curvas de calibración y regresión lineal obtenidos para ambos analitos y que permiten establecer los parámetros analíticos del sensor. Entre estos parámetros analíticos se encuentran el límite de detección, el cual fue de $2.4 \mu\text{M}$ (0.94 mg L^{-1}) para el caso de la permetrina, un orden de magnitud por debajo que el LOD de 3-fenoxibencialdehído (3-PBA), que fue de $19.6 \mu\text{M}$ (3.9 mg L^{-1}). Con respecto a la sensibilidad del método para la detección de permetrina se obtuvo $0.04 \text{ mA/ mg L}^{-1}$, en contraste con el valor de $0.0074 \text{ mA/ mg L}^{-1}$ del 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). Finalmente, el rango dinámico de la permetrina fue más amplio, $0.94 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ con respecto al rango de $3.9-10 \text{ mg L}^{-1}$ de 3-fenoxibencialdehído (3-PBA).

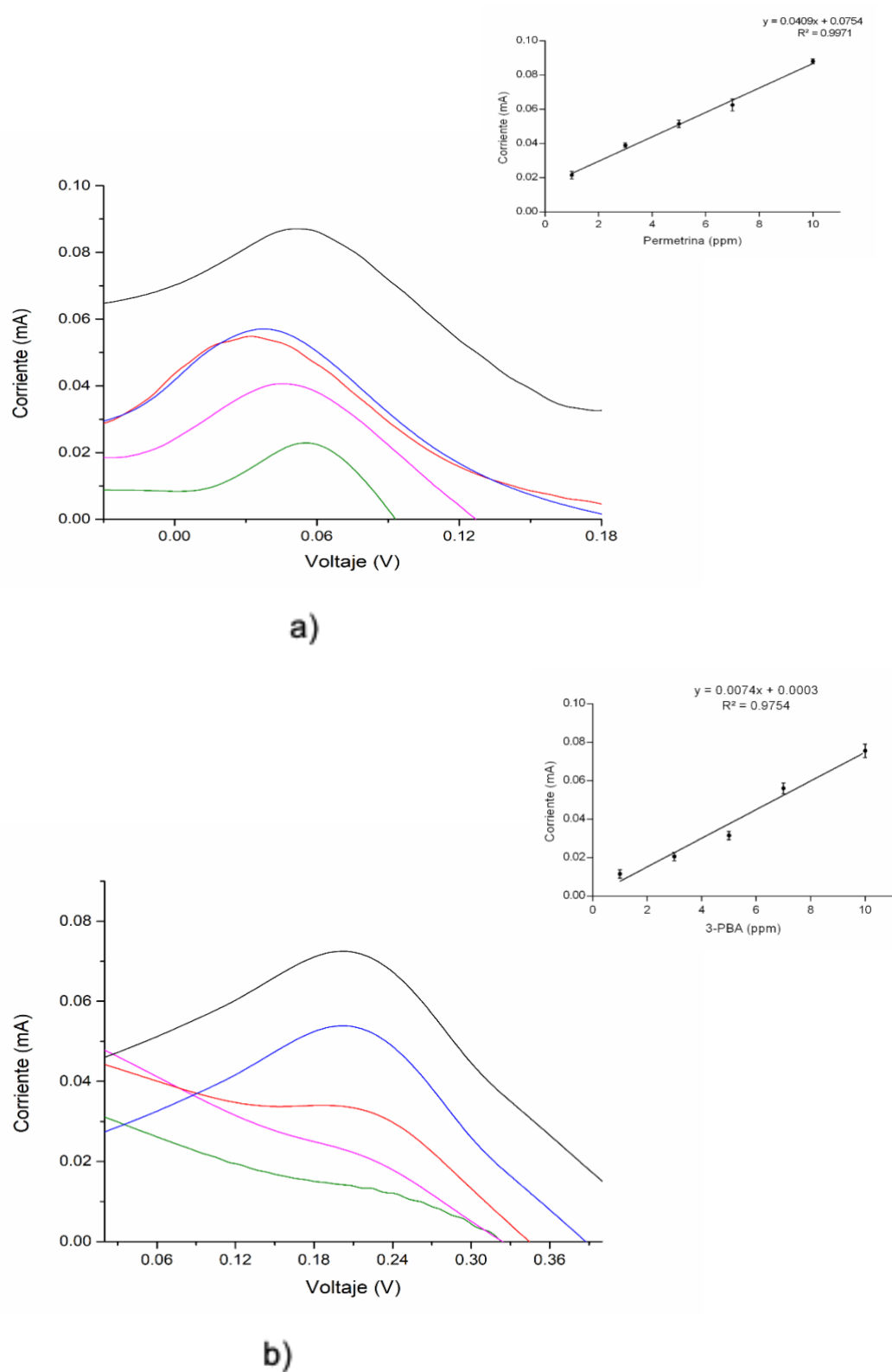


Figura 15 Voltamperometría cíclica de (a) permetrina y (b) 3-PBA a concentraciones de 10 ppm (-), 7 ppm (-), 5 ppm (-), 3 ppm (-) y 1 ppm (-). En inserto se encuentran la curva de calibrado de cada analito

En este sentido, Arip y colaboradores, desarrollaron un biosensor potenciométrico basado en cambios de pH mediados por células inmovilizadas del hongo *Lentinus sajor-caju* ante la presencia del pesticida permetrina en muestras de madera. Bajo estas condiciones se obtuvo un LOD 1 μM y un rango de trabajo de 1 a 10 μM [32], el cual está en el mismo orden de magnitud que el que se obtuvo en este trabajo (2.4 μM). Mientras que, Castellarnau et al., reportó un método de detección de deltametrina basado en la espectroscopía de impedancia (EIS), obteniendo un LOD de 0.303 $\mu\text{g L}^{-1}$, [31]. Finalmente, Fruhmann et al 2018, reportó la detección de deltametrina, obteniendo un LOD de 4.7 $\mu\text{g/L}$ [26], el cual está por encima de lo obtenido en este proyecto.

Lo anterior demuestra el potencial del biosensor basado en lac/esterasa para la determinación de piretroides, al estar en congruencia con los parámetros analíticos reportados en otros trabajos tanto con inmunoensayos como con principios electroquímicos.

CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES

La bacteria *S. aureus* T3C3 fue capaz de producir enzimas lacasas en un medio de cultivo de baja concentración de nutrientes y con sulfato de cobre como cofactor. Mientras que, la producción de enzimas esterasas se logró empleando la cepa *B. cereus* T3A1, la cual creció en un medio rico en sales de potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) que favorecen la producción de estas enzimas. La actividad enzimática de las enzimas obtenidas fue evaluada por espectrofotometría UV-Vis, obteniendo un valor de 331.5 U mg^{-1} para las lacasas y 103.7 U mg^{-1} para las esterasas.

Estas enzimas fueron sometidas a una evaluación cualitativa frente al insecticida piretroide permetrina y a uno de sus metabolitos, el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). En el tratamiento con enzimas lacasas se observó un ligero decremento en la intensidad del pico de absorción de la permetrina y el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA), siendo más notorio en la permetrina. Por otro lado, el tratamiento de las esterasas solo fue aplicado en la permetrina, ya que estas enzimas solamente son capaces de hidrolizar compuestos que contienen enlaces éster.

El resultado obtenido con esta enzima fue una ligera disminución en el pico de absorción de este piretroide, al cabo de 4 horas de monitoreo. A pesar de que esta prueba no es confirmatoria para determinar si hay reacción de las enzimas con estos analitos, al menos da indicios que la presencia de ellas podían tener una potencial interacción con los analitos de interés. En particular las enzimas lacasas poseen la capacidad de catalizar reacciones de transferencia de electrones en compuestos fenólicos. Por otro lado, las enzimas esterasas son capaces de catalizar la hidrólisis de un enlace químico de tipo éster de la molécula.

Las enzimas fueron inmovilizadas en un electrodo de oro y este proceso tuvo un efecto en la actividad enzimática de las enzimas, trayendo como consecuencia una pérdida del 39 % de la actividad inicial de las enzimas esterasas. Por otro lado, las micrografías de los electrodos inmovilizados presentaron un notable incremento del grosor de la superficie de oro, siendo inicialmente de 49 nm y al finalizar la inmovilización incrementó hasta 71 nm, además de presentar una morfología más irregular después de la adición de las moléculas. Lo anterior se atribuye a la posible formación de un sistema multicapa a partir de la unión enzima-enzima durante el proceso de inmovilización.

Los electrodos con enzimas inmovilizadas fueron empleados en mediciones electroquímicas de la permetrina el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA), empleando el método de voltamperometría cíclica. El electrodo con enzimas lacasa tuvo una menor eficiencia en la generación de corriente con respecto al electrodo que tenía lacasas/esterasas, indicando que la adición de esterases al electrodo, favorece la detección del biosensor. La detección de la permetrina en presencia de la esterasa/lacasa generó un 28% más de corriente, caso similar ocurre en la detección del 3-fenoxibencialdehído (3-PBA) donde el aumento se da en un 30%.

Finalmente se determinaron los parámetros analíticos del biosensor electroquímico basado en lacasa/esterasa. El límite de detección para la permetrina fue de $2.4 \mu\text{M}$ (0.94 mg L^{-1}) y $19.6 \mu\text{M}$ (3.9 mg L^{-1}) para el 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). Con respecto a la sensibilidad del método para la detección de permetrina se obtuvo $0.04 \text{ mA/ mg L}^{-1}$, en contraste con el valor de $0.0074 \text{ mA/ mg L}^{-1}$ del 3-fenoxibencialdehído (3-PBA). El rango dinámico de la permetrina fue más amplio, de 0.94 a 10 mg L^{-1} con respecto al rango de 3.9 a 10 mg L^{-1} del 3-fenoxibencialdehído (3-PBA).

Los resultados obtenidos fueron comparables con estudios previamente reportados para la detección de estos compuestos empleando otros bioreceptores así como otras técnicas. Esto demuestra que el sistema bi-enzimático lacasa/esterasa posee un gran potencial para ser usado como bioreceptor en biosensores electroquímicos para la detección de pesticidas piretroides, aportando información al desarrollo de nuevas herramientas analíticas.

PERSPECTIVAS

- Implementar un proceso de purificación de los extractos enzimáticos para obtener enzimas puras que pudieran favorecer el desempeño del biosensor y así obtener aún mejores niveles de detección.
- Implementar una caracterización detallada de los extractos enzimáticos para descartar la producción de más enzimas.
- Optimizar el protocolo de detección empleando diferentes condiciones de pH, concentración de enzimas, evaluar interferencias, etc.
- Implementar el protocolo de medición en el análisis de muestras reales con concentraciones de pesticidas piretroides, así como validar el método a través de técnicas estandarizadas, como HPLC o GC.
- Probar el bioreceptor bi-enzimático lacasa/esterasa para otro tipo de pesticidas o compuestos de interés prioritarios.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Aamand, M. Gavrilescu, S. Agathos, and F. Fava, "Emerging pollutants in the environment : present and future challenges in biomonitoring , ecological risks and bioremediation," vol. 32, no. 1, pp. 147–156, 2015.
- [2] L. Santos, A. Araújo, A. Fachini, A. Pena, and M. Delerue-Matos, C Montenegro, "Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.," *J Hazard Mater*, vol. 175, pp. 45–95, 2010.
- [3] K. H. Kim, E. Kabir, and S. A. Jahan, "Exposure to pesticides and the associated human health effects," *Sci. Total Environ.*, vol. 575, pp. 525–535, 2017.
- [4] T. E. Félix-Cañedo, J. C. Durán-Álvarez, and B. Jiménez-Cisneros, "The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources," *Sci. Total Environ.*, vol. 454–455, pp. 109–118, 2013.
- [5] A. J. Meza-Montenegro, M. M. Valenzuela-Quintanar, A. I. Balderas-Cortés, J. J. Yañez-Estrada, L. Gutiérrez-Coronado, M. L. Cuevas-Robles, A. Gandolfi, "Exposure assessment of organochlorine pesticides, arsenic, and lead in children from the major agricultural areas in Sonora, Mexico.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 64, no. 3, pp. 519–527, 2013.
- [6] R. Zepeda-Arce, A. E. Rojas-García, A. Benitez-Trinidad, J. F. Herrera-Moreno, I. M. Medina-Díaz, B. S. Barrón-Vivanco, G. P. Villegas, I. Hernández-Ochoa, M. de J. Sólis Heredia, and Y. Y. Bernal-Hernández, "Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides," *Environ. Toxicol.*, vol. 32, no. 6, pp. 1754–1764, 2017.
- [7] A. Ferrer, "Intoxicación por plaguicidas," *An. Sist. Sanit. Navar.*, vol. 26, no. SUPPL. 1, pp. 155–171, 2003.
- [8] A. M. Saillenfait, D. Ndiaye, and J. P. Sabaté, "Pyrethroids: Exposure and health effects - An update," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 218, no. 3, pp. 281–292, 2015.
- [9] G. A. E. Mostafa, "Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides," *Open Electrochem. J.*, vol. 2, pp. 22–42, 2010.
- [10] G. Sandoval and E. J. Herrera-López, *Chapter 22 Lipase, Phospholipase, and Esterase Biosensors (Review)*, vol. 1835. 2013.
- [11] B. Bucur, F. D. Munteanu, J. L. Marty, and A. Vasilescu, "Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection," *Biosensors*, vol. 8, no. 2, pp. 1–28, 2018.
- [12] G. Hernandez-Vargas, J. E. Sosa-Hernández, S. Saldarriaga-Hernandez, A. M. Villalba-Rodríguez, R. Parra-Saldivar, and H. M. N. Iqbal, "Electrochemical biosensors: A solution to pollution detection with reference to environmental contaminants," *Biosensors*, vol. 8, no. 2, pp. 1–21, 2018.
- [13] G. F. Grawe, R. De Oliveira, E. De Andrade Narciso, S. K. Moccelini, A. J. Terezo, M. A. Soares, and M. Castilho, "Electrochemical biosensor for carbofuran pesticide based on esterases from *Eupenicillium shearii* FREI-39 endophytic fungus," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 63, pp. 407–413, 2014.
- [14] M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-nava, J. M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martínez-Chapa, D. Barceló, and R. Parra, "Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds," *Trends Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 21–45, 2015.
- [15] M. Ferdes and G. Paraschiv, "LACCASE ENZYME PRODUCTION ANDBIOMASS GROWTH IN LIQUID CULTURES OFWOOD-DEGRADING FUNGAL," no. August, 2018.
- [16] N. P. Muthukumarasamy and S. Murugan, "Production, purification and application of bacterial laccase: A review," *Biotechnology*, vol. 13, no. 5. pp. 196–205, 2014.

- [17] J. Wang, J. Feng, W. Jia, S. Chang, S. Li, and Y. Li, "Lignin engineering through laccase modification: A promising field for energy plant improvement," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [18] M. J. Navarro-González, "ENZIMAS LIPOLITICAS BACTERIANAS: PROPIEDADES, CLASIFICACIÓN, ESTRUCTURA, APLICACIONES TECNOLOGICAS Y ASPECTOS LEGALES," *An. Vet. Murcia*, vol. 28, pp. 45–65, 2012.
- [19] Y. V. Samoylova, K. N. Sorokina, M. V. Romanenko, and V. N. Parmon, "Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII," *Extremophiles*, vol. 22, no. 2, pp. 271–285, 2018.
- [20] S. B. Wuan Lii, C. Wong, J. R. Al-Obaldi, N. Rahmad, A. Mujahid, and M. Müller, "Ability of endophytic fungi isolated from *Nepenthes ampullaria* to degrade polyurethane Shirley," *Malays. J. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 172–179, 2017.
- [21] P. Riangrungrroj, C. S. Bever, B. D. Hammock, and K. M. Polizzi, "A label-free optical whole-cell *Escherichia coli* biosensor for the detection of pyrethroid insecticide exposure," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [22] I. Ortíz, M. A. Avila-Chávez, and L. G. Torres, "Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio," *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. y Algal*, vol. 4, no. 1, p. 3, 2013.
- [23] M. K. Morgan, D. K. MacMillan, D. Zehr, and J. R. Sobus, "Pyrethroid insecticides and their environmental degradates in repeated duplicate-diet solid food samples of 50 adults," *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 40–45, 2018.
- [24] M. H. El-Saeid and H. A. Khan, "Determination of pyrethroid insecticides in crude and canned vegetable samples by supercritical fluid chromatography," *Int. J. Food Prop.*, vol. 18, no. 5, pp. 1119–1127, 2015.
- [25] Y. Wang, L. Shen, Z. Gong, J. Pan, X. Zheng, and J. Xue, "Analytical methods to analyze pesticides and herbicides," *Water Environ. Res.*, vol. 91, no. 10, pp. 1009–1024, 2019.
- [26] P. Fruhmann, A. Sanchis, L. Mayerhuber, T. Vanka, C. Kleber, J. Salvador, and M. Marco, "Immunoassay and amperometric biosensor approaches for the detection of deltamethrin in seawater," pp. 5923–5930, 2018.
- [27] H.-J. Lee, G. Shan, T. Watanabe, D. Stoutamire, S. Gee, and BD Hammock, "Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid deltamethrin," *J Agric Food Chem.*, vol. 50, pp. 5526–5532, 2002.
- [28] H.-J. Lee, G. Shan, K. Ahn, E.-K. Park, T. Watanabe, and S. Gee, "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid cypermethrin," *J Agric Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1039–1043, 2004.
- [29] Y. Kong, Q. Zhang, W. Zhang, S. Gee, and P. Li, "Development of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the pyrethroid insecticide deltamethrin," *J Agric Food Chem.*, vol. 58, no. 14, p. 8189–8195., 2010.
- [30] X. Liu, L. Li, Y. Liu, X. Shi, W. Li, and Y. Yang, "Ultrasensitive detection of deltamethrin by immune magnetic nanoparticles separation coupled with surface plasmon resonance sensor," *Biosens Bioelectron.*, vol. 59, pp. 328–334, 2014.
- [31] M. Castellarnau, J. Ramon-Azcon, Y. Gonzalez-Quinteiro, J. Lopez, J. Grimalt, and M. P. Marco, "Assessment of analytical methods to determine pyrethroids content of bednets," *Trop. Med Int Heal.*, vol. 22, no. 1, pp. 41–51, 2017.
- [32] M. N. M. Arip, L. Y. Heng, M. Ahmad, and S. Ujang, "A cell-based potentiometric biosensor using the fungus *Lentinus sajor-caju* for permethrin determination in treated wood," *Talanta*, vol. 116, pp. 776–781, 2013.

- [33] O. Domínguez-Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, P. Recio-Cebrián, and M. J. Arcos-Martínez, "Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin.," *Sci. Total Environ.*, vol. 426, pp. 346–350, 2012.
- [34] S. Gangola, A. Sharma, P. Bhatt, P. Khati, and P. Chaudhary, "Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [35] P. Bhatt, Y. Huang, H. Zhan, and S. Chen, "Insight Into Microbial Applications for the Biodegradation of Pyrethroid Insecticides," vol. 10, no. August, pp. 1–19, 2019.
- [36] X. Jin, X. Yu, G. Zhu, Z. Zheng, F. Feng, and Z. Zhang, "Conditions Optimizing and Application of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccase-catalyzed Pesticide Degradation," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 35787, 2016.
- [37] J. A. Mir-Tutusaus, M. Masís-Mora, C. Corcellas, E. Eljarrat, D. Barceló, M. Sarrà, and C. E. Rodríguez-Rodríguez, "Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*," *Sci. Total Environ.*, vol. 500, pp. 235–242, 2014.
- [38] J. Zhao, X. Chen, D. Jia, and K. Yao, "Identification of fungal enzymes involving 3-phenoxybenzoic acid degradation by using enzymes inhibitors and inducers," *Methods X*, vol. 7, p. 100772, 2020.
- [39] S. Sondhi, P. Sharma, S. Saini, N. Puri, and N. Gupta, "Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali- stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–10, 2014.
- [40] T. Sharma, A. Sharma, and S. S. Kanwar, "Purification and Characterization of an Extracellular High Molecular Mass Esterase from *Bacillus pumilus* Purification and Characterization of an Extracellular Molecular Mass Esterase from *Bacillus pumilus*," no. December, 2016.
- [41] Z. Zhang, J. Liu, J. Fan, Z. Wang, and L. Li, "Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1009, pp. 65–72, 2018.
- [42] E. Casero, M. D. Petit-Domínguez, L. Vázquez, I. Ramírez-Asperilla, a M. Parra-Alfambra, F. Pariente, and E. Lorenzo, "Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination.," *Talanta*, vol. 115, pp. 401–8, Oct. 2013.
- [43] S. K. Mishra and S. K. Srivastava, "Production of extracellular laccase from bacterial strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different parameter.," *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, vol. 13, no. 3, p. 1645–1650., 2016.
- [44] A. Silva-Salinas, "Degradación del ibuprofeno a través de la aplicación de microorganismos productores de oxidoreductasas en el area de Nuevo León, México.," UANL, 2017.
- [45] G. Yasar, U. G. Guven, E. Guduk, and F. Aktas, "Partial purification and characterization of the novel halotolerant and alkalophilic laccase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2.," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 37, no. 2, pp. 268–27, 2019.
- [46] F. J. Plou, M. Ferrer, O. M. Nuero, M. V Calvo, M. Alcalde, F. Reyes, and A. Ballesteros, "<Analysis of Tween 80 as an esterase.pdf>," vol. 12, no. 3, pp. 183–186, 1998.
- [47] S. D. Ashrafi, S. Rezaei, H. Forootanfar, A. H. Mahvi, and M. A. Faramarzi, "The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 85, pp. 173–181, Nov. 2013.
- [48] C. Cupp-Enyard, "Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate.," *JoVE (Journal Vis. Exp.)*, vol. 19, p. e899, 2008.
- [49] J. N. Talbert and J. M. Goddard, "Enzymes on material surfaces.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 93, pp. 8–19, May 2012.

- [50] X. Fan, W. Liang, Y. Li, H. Li, and X. Liu, "Identification and immobilization of a novel cold-adapted esterase, and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated vegetables," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, p. 149, 2017.
- [51] W. Yang, J. Wang, S. Zhao, Y. Sun, and C. Sun, "Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment," *Electrochem. commun.*, vol. 8, no. 4, pp. 665–672, 2006.
- [52] A. Yarman and F. W. Scheller, "MIP-esterase/Tyrosinase Combinations for Paracetamol and Phenacetin.," *Electroanal.* 28(9), vol. 28, no. 9, pp. 2222–2227, 2016.
- [53] A. L. Crumbliss, J. G. Stonehuerner, R. W. Henkens, J. Zhao, and J. P. O'Daly, "A carrageenan hydrogel stabilized colloidal gold multi-enzyme biosensor electrode utilizing immobilized horseradish peroxidase and cholesterol oxidase/cholesterol esterase to detect cholesterol in serum and whole blood," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 8, no. 6, pp. 331–337, 1993.